

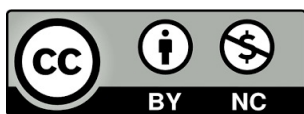
Alba Moratiel Pellitero

Biomarcadores de respuesta a
inmunoterapia en pacientes con
cáncer de pulmón no célula
pequeña: composición de
microbiota, ácidos grasos de
cadena corta y permeabilidad
intestinal

Director/es

Isla Casado, María Dolores
Gálvez Buerba, Eva María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

BIOMARCADORES DE RESPUESTA A
INMUNOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER
DE PULMÓN NO CÉLULA PEQUEÑA:
COMPOSICIÓN DE MICROBIOTA, ÁCIDOS
GRASOS DE CADENA CORTA Y PERMEABILIDAD
INTESTINAL

Autor

Alba Moratíel Pellitero

Director/es

Isla Casado, María Dolores
Gálvez Buerba, Eva María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2025



Universidad
Zaragoza

TESIS DOCTORAL

TÍTULO

Biomarcadores de respuesta a inmunoterapia en
pacientes con cáncer de pulmón no célula
pequeña: composición de microbiota, ácidos
grasos de cadena corta y permeabilidad intestinal

AUTOR

Alba Moratiel Pellitero

DIRECTORES DE TESIS

María Dolores Isla Casado

Eva María Gálvez Buerba

FACULTAD DE MEDICINA / UNIZAR

Curso académico 2024/2025

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosómico.

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta.

ALK: Quinasa del linfoma anaplásico.

ASV: Variante de secuencia de amplicones.

AUC: Área bajo la curva.

BRAF: B-Raf proto-oncogen.

CCPG: Péptido cíclico citrulinado.

CCR: Cáncer colorrectal.

CEI: Células epiteliales intestinales.

CEICA: Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón.

CPCNP: Cáncer de pulmón de célula no pequeña.

CPCP: Cáncer de pulmón de célula pequeña.

CTLA-4: Receptor de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos.

ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group, Performance Status.

EE: Enfermedad estable.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

FISH: Hibridación in situ con fluorescencia.

GC-MS: Cromatografía de gases-espectroscopia de masas.

Gy: Grays.

h: Horas.

HCULB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

HDAC: Enzimas histona deacetilasa.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

IASLC: Asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón.

IC: Intervalo de confianza.

ICB-CSIC: Instituto de Carboquímica de Zaragoza.

ICI: Inhibidor de punto de control inmunitario.

IHQ: Inmunohistoquímica.

irAEs: Efectos adversos inmunorrelacionados.

kg: Kilogramos.

KRAS: Virus del sarcoma de rata Kirsten

L: Litros.

LAL: Lyophilized Ambocyte Lysate.

LefSe: Linear discriminant analysis Effect Size.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LPS: Lipopolisacárido.

MET: Gen transición epitelial mesenquimal

ng: Nanogramo.

NGS: Secuenciación de nueva generación.

NR: No respondedores.

NTRK: Quinasa del receptor de tirosina neurotrófica.

M: Moles.

min: Minutos.

mg: Miligramos.

ml: Mililitros.

mM: Milimoles.

μL: Microlitros.

μM: Micromoles.

p: Valor de probabilidad.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PD-1: Receptor de muerte programada 1.

PD-L1: Ligando 1 de receptor de muerte programada.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PR: Progresión de enfermedad.

R: Respondedores.

RC: Respuesta completa.

RP: Respuesta parcial.

RECIST: Response Evaluation Criteria In Solid Tumors.

rpm: Revoluciones por minuto.

s: Segundos.

SG: Supervivencia global.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

Resumen:

La presente tesis doctoral investiga el papel de la microbiota intestinal, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la permeabilidad intestinal como biomarcadores de respuesta y toxicidad a la inmunoterapia en pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña (CPCNP). El CPCNP es una de las principales causas de mortalidad oncológica, con opciones terapéuticas en constante evolución, incluyendo el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) como los anti-PD-1/PD-L1. Sin embargo, la selección de pacientes que responderán favorablemente a la inmunoterapia sigue siendo un desafío clínico.

El cáncer de pulmón se desarrolla a partir de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan la proliferación celular, la apoptosis y la respuesta inmune. La inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del CPCNP avanzado, pero su eficacia es variable y solo un porcentaje reducido de pacientes obtiene beneficios duraderos. Aunque la expresión de PD-L1 es el principal biomarcador utilizado para guiar la administración de ICI, su valor predictivo es limitado, lo que resalta la necesidad de encontrar nuevos marcadores pronósticos.

En este contexto, la microbiota intestinal ha surgido como un factor clave en la regulación de la respuesta inmune y la homeostasis del organismo. Estudios recientes han demostrado que la composición del microbioma intestinal puede influir en la respuesta a la inmunoterapia, sugiriendo un eje intestino-pulmón que podría modular la eficacia de los tratamientos. Se ha observado que una mayor diversidad de la microbiota intestinal y la presencia de ciertas bacterias beneficiosas, como *Akkermansia muciniphilia*, se asocian con mejores respuestas a la inmunoterapia.

Por otro lado, los AGCC, siendo productos de la fermentación bacteriana de la fibra dietética, desempeñan un papel esencial en la modulación de la respuesta inmune. Entre ellos, el butirato ha mostrado efectos antiinflamatorios y antitumorales, favoreciendo la actividad de las células T CD8+ y regulando la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos. La evidencia sugiere que los pacientes con niveles más altos de AGCC pueden presentar una mejor respuesta a la inmunoterapia, mientras que su deficiencia podría estar relacionada con resistencia al tratamiento y mayor toxicidad.

Otro aspecto crucial es la permeabilidad intestinal, cuya alteración puede permitir la translocación de endotoxinas y otras moléculas proinflamatorias al torrente sanguíneo, promoviendo una respuesta inmunitaria exacerbada. La citrulina, la zonulina y la endotoxina son marcadores que reflejan la integridad de la barrera intestinal y podrían correlacionarse con la respuesta y toxicidad a la inmunoterapia. Niveles elevados de zonulina y endotoxina se han relacionado con inflamación sistémica y un peor pronóstico en pacientes oncológicos.

Este estudio prospectivo, realizado en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, analiza la relación entre estos biomarcadores y la respuesta a los ICI en pacientes con CPCNP en estadio III irresecable y estadio IV. Se espera que los hallazgos contribuyan a optimizar la selección de pacientes para inmunoterapia y desarrollar estrategias para modular la microbiota intestinal y mejorar los resultados clínicos.

Índice

1. Introducción	9
1.1 Carcinogénesis.....	9
1.2 Epidemiología.....	11
1.3 Diagnóstico anatomopatológico	12
1.4 Estadificación: TNM 8ª Edición	13
1.4.1 Determinación del tamaño tumoral (T)	15
1.4.2 Descripción del estado ganglionar (N).....	15
1.4.3 Definición de las metástasis (M).....	16
1.5 Inmunoterapia.....	16
1.5.1 Estadio III irresecable.....	18
1.5.2 Estadio IV.....	18
1.6 Microbiota y cáncer	19
1.7 Metabolitos: ácidos grasos de cadena corta.....	23
1.7.1 Modulación de la configuración de metabolitos gastrointestinales por parte del microbioma	24
1.7.2 Producción de metabolitos de novo en el microbioma.....	25
1.7.3 Reprogramación metabólica de las células inmunitarias.....	25
1.7.4 Modulación transcripcional y epigenética de genes relacionados con el sistema inmunitario	26
1.7.5 Evidencia del estudio de AGCC en pacientes con CCR.....	27
1.8 Permeabilidad de la barrera intestinal.....	28
1.8.1 Citrulina y anticuerpos anticitrulina	30
1.8.2 Zonulina.....	30
1.8.3 Endotoxina.....	31
2. Hipótesis y objetivos	31
2.1 Objetivo principal	32
2.2 Objetivos secundarios	32
3. Materiales y métodos	32
3.1 Diseño del estudio.....	32
3.2 Criterios de inclusión	32
3.3 Criterios de exclusión	33
3.4 Variables y estudio descriptivo	33
3.4.1 Estudio descriptivo	33
3.4.2 Tratamiento.....	34
3.4.3 PD-L1	35

3.4.4	Toxicidad inmunorrelacionada	35
3.4.5	Muestras de heces.....	36
3.4.6	Muestras de sangre	38
3.5	Análisis estadístico	45
3.6	Comité Ético	45
4.	Resultados	46
4.1	Características basales	46
4.2	Toxicidad inmunorrelacionada y respuesta.....	47
4.3	Composición de la microbiota intestinal.....	50
4.4	AGCC	52
4.5	Biomarcadores de permeabilidad de membrana en sangre periférica.....	54
4.5.1	Distribución serológica.....	54
4.5.2	Análisis de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.....	55
4.5.3	Análisis estadístico integrador.....	59
5.	Discusión	61
6.	Conclusiones	65
7.	Retos y perspectivas futuras.....	66
8.	Agradecimientos.....	66
9.	Bibliografía	67
10.	Certificado CEICA.....	76

1. Introducción

1.1 Carcinogénesis

El cáncer de pulmón es un tipo de neoplasia maligna que se origina en los tejidos pulmonares y representa una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial. Se desarrolla a través de un proceso multifactorial complejo que involucra interacciones entre factores genéticos, epigenéticos y ambientales.

Este proceso se inicia con alteraciones genéticas acumulativas que afectan a genes clave, responsables de la regulación del ciclo celular, la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la apoptosis, generando un microambiente que favorece la proliferación celular descontrolada (1).

- Molecular:

El desarrollo del cáncer de pulmón suele comenzar con la exposición a agentes carcinogénicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el tabaco o contaminantes ambientales como el radón. Estos agentes inducen daño directo en el ADN, dando como resultado mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales.

Entre los oncogenes más frecuentemente implicados destacan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), virus del sarcoma de rata Kirsten (KRAS) y quinasa del linfoma anaplásico (ALK), mientras que los genes supresores tumorales como TP53 y RB1 suelen estar inactivados (2). La mutación en genes como EGFR o translocaciones en ALK promueven una activación constitutiva de vías de señalización como PI3K/AKT/mTOR o RAS/RAF/MEK/ERK, dando como resultado una proliferación celular incontrolada. Por otro lado, la pérdida de función de TP53, una proteína central en la respuesta al daño en el ADN, permite la supervivencia de células con mutaciones, perpetuando el proceso oncogénico. Figura 1(3).

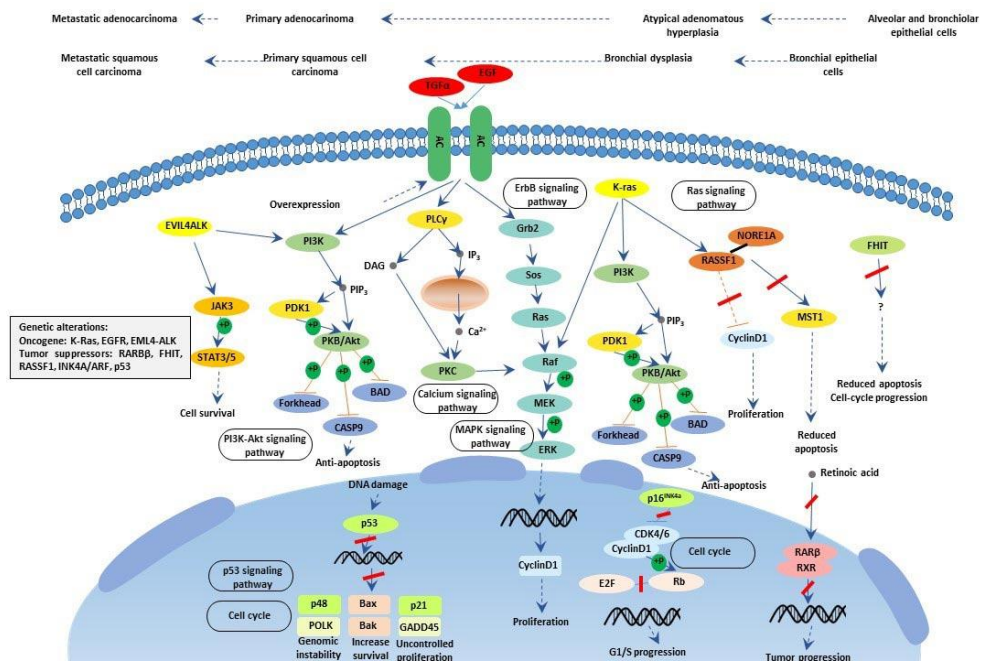


Figura 1. Diagrama de vías de señalización relacionadas con el desarrollo del cáncer de pulmón.

- Alteraciones epigenéticas y heterogeneidad tumoral:

Además de las mutaciones genéticas, las modificaciones epigenéticas, como la hipermetilación del promotor de genes supresores de tumores, como por ejemplo de CDKN2A, y la alteración en la acetilación de histonas, contribuyen significativamente a la carcinogénesis pulmonar. Estas alteraciones epigenéticas no solo silencian genes críticos para la regulación celular, sino que también favorecen un microambiente tumoral inmunosupresor.

El cáncer de pulmón es altamente heterogéneo, tanto genéticamente como fenotípicamente, lo que dificulta su tratamiento. Esta heterogeneidad puede observarse incluso dentro de subtipos histológicos principales, como el carcinoma de células no pequeñas (CPCNP) y el carcinoma de células pequeñas (CPCP). Esto se traduce en patrones de resistencia terapéutica y evolución tumoral dinámica.

- Microambiente tumoral:

El microambiente tumoral en el cáncer de pulmón también juega un papel crucial en su desarrollo y progresión. Las células tumorales interactúan con células del estroma, fibroblastos y células inmunitarias para evadir la vigilancia inmunitaria, estimular la angiogénesis y promover la invasión y el desarrollo de metástasis. Por ejemplo, la sobreexpresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en las células tumorales permite la inhibición de la actividad citotóxica de los linfocitos T. Figura 2. (4)

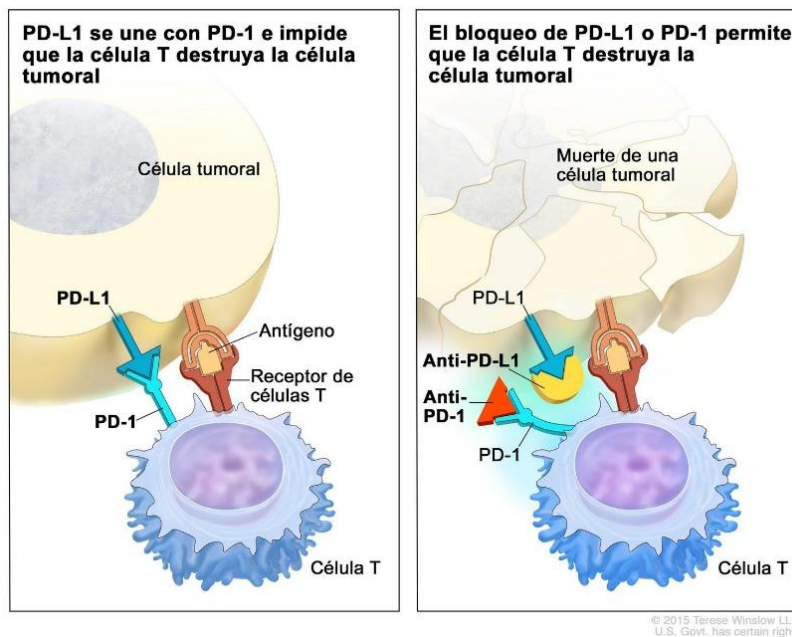


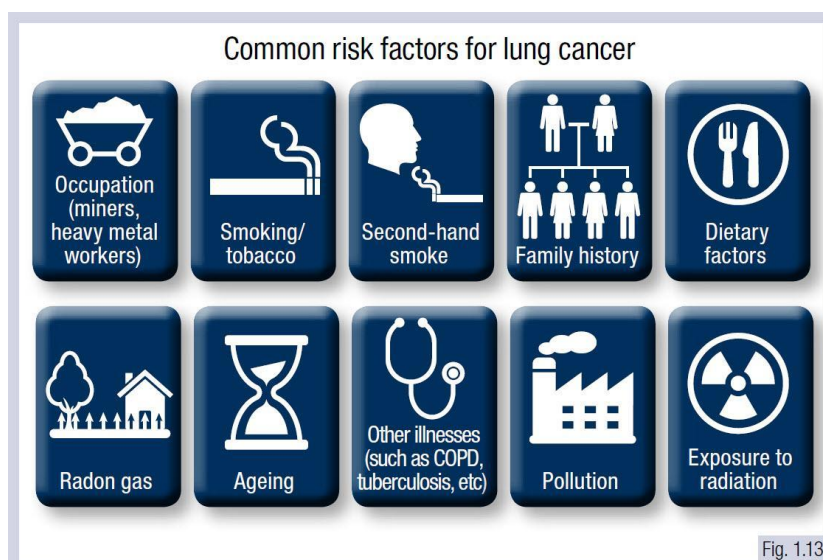
Figura 2. Inhibidor de puntos de control inmunitario. Las proteínas de puntos de control, como PD-L1 (en las células tumorales) y PD-1 (en las células T), ayudan a mantener el control de las reacciones inmunitarias. La unión de PD-L1 a PD-1 impide que la célula T destruya las células tumorales del cuerpo (panel izquierdo). El bloqueo de la unión de PD-L1 con PD-1 mediante un inhibidor de puntos de control inmunitario (anti-PD-L1 o anti-PD-1) permite que las células T destruyan las células tumorales (panel derecho).

- Metástasis:

El cáncer de pulmón muestra una alta propensión a la diseminación metastásica, especialmente a nivel cerebral, óseo y hepático. Este fenómeno está facilitado por mecanismos como la transición epitelio-mesenquimal, que confiere propiedades migratorias e invasivas a las células tumorales.

1.2 Epidemiología

Se estima que, en 2020, hubo aproximadamente 2,2 millones de nuevos casos de cáncer de pulmón y 1,8 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. El tabaquismo es el principal factor de riesgo para su desarrollo, siendo responsable de la gran mayoría de los casos. Otros factores de riesgo incluyen la exposición a carcinógenos ambientales como el radón, la contaminación del aire, la exposición laboral a sustancias químicas, el consumo de alcohol, el sedentarismo, y los antecedentes familiares de la enfermedad. Figura 3. (5)



COPD, Chronic obstructive pulmonary disease

Figura 3. Los factores de riesgo no relacionados con el tabaquismo incluyen la exposición ocupacional al asbesto, cromo, arsénico, cadmio, sílice y níquel, así como ser fumadores pasivos, los contaminantes del aire exterior, enfermedades pulmonares previas, exposición al radón y factores dietéticos.

En España se estima que en 2025 habrá 34.506 nuevos diagnósticos de cáncer de pulmón, siendo 23.442 en hombres y 11.064 en mujeres (6). A pesar de su elevada incidencia, dada su alta tasa de mortalidad, su prevalencia a los cinco años es relativamente baja (41.143 pacientes en 2020).

Estas cifras se reflejan en lo reportado en España en el año 2022: fallecieron 114.828 personas por cáncer, de las cuales 22.727 fue por cáncer de pulmón, siendo el tumor con mayor mortalidad, seguido del cáncer de colon con 11.142 muertes notificadas.

A pesar de este incremento numérico en las muertes por cáncer, de forma general, la mortalidad por cáncer en España ha experimentado un fuerte descenso en las últimas décadas gracias a las actividades preventivas, el diagnóstico precoz, los avances terapéuticos y el menor consumo de tabaco en hombres.

1.3 Diagnóstico anatomopatológico

A nivel histológico, el cáncer de pulmón se puede diferenciar en dos grandes grupos: CPCP (15-20%) y CPCNP (80-85%). Dentro del CPCNP existen varios subgrupos histopatológicos: adenocarcinoma (que es el más frecuente), carcinoma escamoso, célula grande, carcinomas pleomórficos, sarcomatoides, neuroendocrinos... Para su correcto estudio y tipificación es preciso el análisis exhaustivo de las muestras anatomopatológicas, comenzando por la realización de técnicas de inmunohistoquímica. Tabla 1 y Figura 4 (7).

Tabla 1. Comparativa entre los principales subtipos histológicos del CPCNP.

Característica	Adenocarcinoma	Carcinoma de células escamosas	Carcinoma de células grandes
Frecuencia	40-50%	20-30%	5-10%
Asociación con tabaquismo	Menor (frecuente en no fumadores)	Alta (fuertemente asociado al tabaquismo)	Alta (frecuente en fumadores)
Localización principal	Periférica (región subpleural o alveolar)	Central (bronquios principales)	Variable (central o periférica)
Características histológicas	Glándulas, producción de mucina	Perlas de queratina, puentes intercelulares	Células grandes, pleomórficas
Alteraciones genéticas comunes	EGFR, ALK, KRAS, ROS1	TP53, amplificaciones de FGFR1	Variadas (menos estudiadas)
Marcadores inmunohistoquímicos	TTF-1, Napsina A	p40, p63	Ninguno específico (depende del subtipo)
Comportamiento clínico	Metástasis tempranas (huesos, cerebro)	Crecimiento local, puede causar cavitación	Rápido, comportamiento agresivo

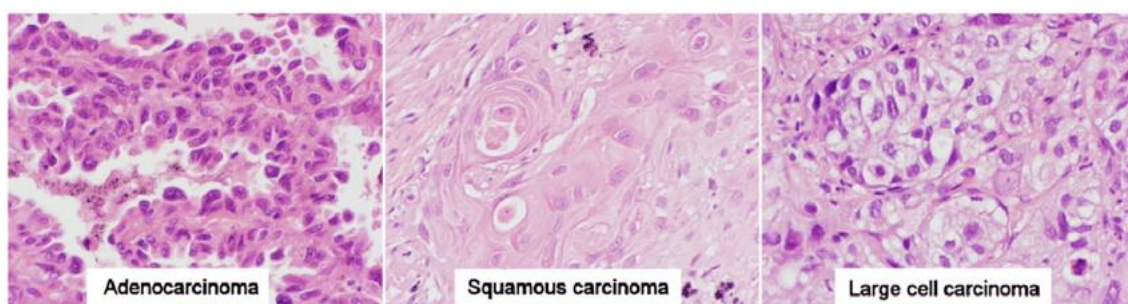


Figura 4. Imagen histopatológica con tinción hematoxilina-eosina de los principales subtipos histológicos del CPCNP: adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes.

Por otro lado, grandes avances recientes como la secuenciación de nueva generación (NGS), han permitido el estudio y conocimiento de múltiples alteraciones genómicas presentes en estos tumores. Hoy en día, ya son múltiples las alteraciones moleculares que cuentan con un tratamiento dirigido y cuyo uso condiciona una mayor eficacia que el tratamiento oncológico convencional, tales como mutaciones en EGFR, reordenamientos en ALK, fusiones en el oncogen c-ros 1, mutaciones en B-Raf proto-oncogen (BRAF), fusiones en el receptor tirosin-cinasa neurotrópico (NTRK), fusiones en el gen RET, mutaciones en el gen KRAS; y mutaciones o amplificaciones en el gen transición epitelial mesenquimal (MET). Por este motivo, es preciso conocer la mayor información genómica posible, idealmente en el momento del diagnóstico, para así poder establecer la estrategia terapéutica óptima. Figura 5.

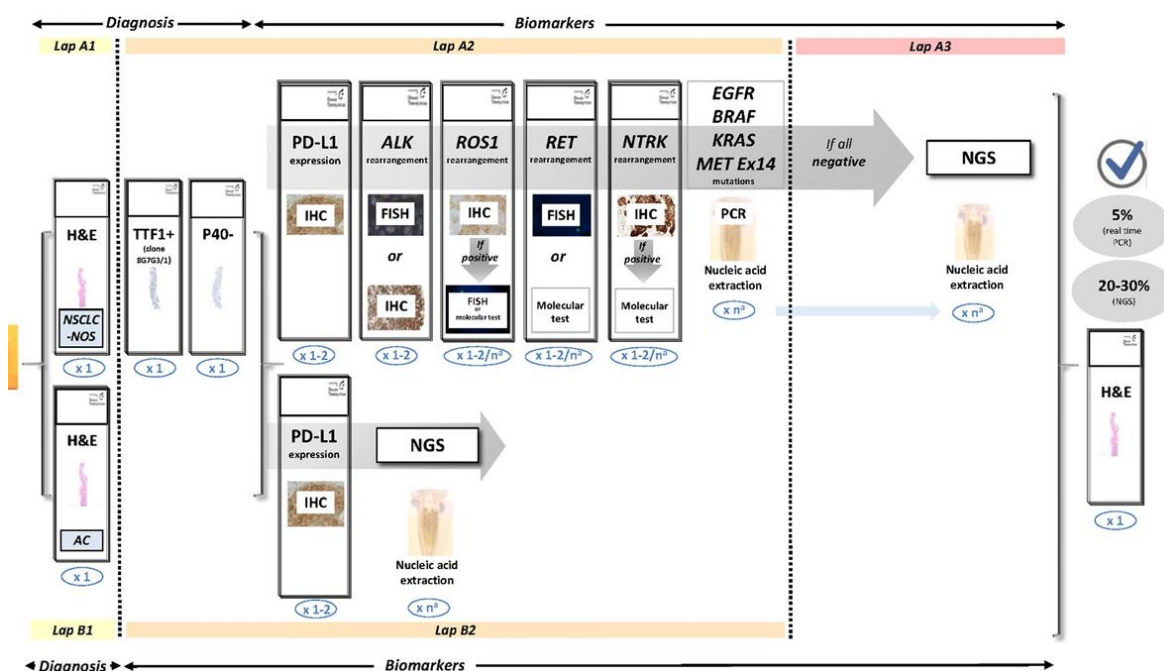


Figura 5. Pruebas de múltiples biomarcadores en muestras de pacientes con CPCNP. El número de secciones para cada prueba se muestra en azul. Adenocarcinoma (AC), quinasa del linfoma anaplásico (ALK), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), hibridación in situ con fluorescencia (FISH), hematoxilina y eosina (H&E), inmunohistoquímica (IHC), virus del sarcoma de rata Kirsten (KRAS), factor de transición epitelial mesenquimal (MET), secuenciación de próxima generación (NGS), quinasa del receptor de tirosina neurotrófica (NTRK), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC-NOS, no especificado de otra manera), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), RET reordenado durante la transfección, oncogen 1 c-ros (ROS1), ligando 1 de muerte programada (PD-L1).

1.4 Estadificación: TNM 8ª Edición

La estadificación precisa del cáncer de pulmón es una parte crucial en el tratamiento de estos pacientes, ya que el estadio al diagnóstico inicial es el predictor de supervivencia más importante. Además, las opciones de tratamiento variarán según el estadio de la enfermedad (8). La puesta en escena “tumor (T), node (N) y metástasis (M)” (TNM) tal como la conocemos hoy en día, fue conceptualizada por Pierre Denoix entre 1943 y 1952

(9). En 1953, se aceptó por el Comité de Nomenclatura y Estadísticas de Tumores de la Unión Internacional para el Control del Cáncer como base para la estadificación anatómica. En 1996, se comprendió la necesidad de desarrollar una base de datos internacional para la validez externa en futuras ediciones del TNM. La Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), al ser la única organización mundial dedicada al estudio del cáncer de pulmón, con representantes de todas las disciplinas involucradas en la atención de esta enfermedad, fue la más indicada para asumir este proyecto, incluyendo la recopilación y el análisis de datos sobre el cáncer de pulmón y la recomendación de actualizaciones de estadificación TNM (10).

La séptima edición de la estadificación TNM se publicó en 2009, basándose en datos retrospectivos de 81.496 pacientes (10). Existían limitaciones dado que los conjuntos de datos originales no fueron diseñados para la estadificación TNM y no todos los descriptores fueron validados. Además, se consideró que la representación mundial era inadecuada y fueron datos recopilados en los años 90, cuando el uso de la tomografía por emisión de positrones (PET) para la estadificación no estaba aún disponible. Estas limitaciones llevaron a la IASLC a una nueva recopilación de datos para desarrollar una nueva edición (11).

La octava estadificación del TNM se publicó en 2017 (11), Tabla 2. Lo más destacado de esta nueva edición es la subclasificación y reclasificación de los diferentes estadios del cáncer de pulmón, basándose en datos de pronóstico. Los principales cambios están relacionados con el tamaño del tumor y el grado de afectación (ambos dentro del estadio T) y la subclasificación de las metástasis extratorácicas (estadio M).

Tabla 2. Clasificación del TNM según octava edición.

T: tumor primario	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado o tumor evidenciado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no evidenciado en pruebas de imagen o broncoscopia
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia mediante broncoscopia de invasión más proximal que el bronquio lobar ^a
T1a (mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo ^b
T1a	Tumor ≤ 1 cm en su diámetro mayor ^a
T1b	Tumor > 1 cm, pero ≤ 2 cm en su diámetro mayor ^a
T1c	Tumor > 2 cm, pero ≤ 3 cm en su diámetro mayor ^a
T2	Tumor > 3 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor, o tumor con alguno de los siguientes criterios ^c : <ul style="list-style-type: none"> - Afecta bronquio principal independientemente de la distancia desde carina, pero sin afectación carinal - Invade pleura visceral - Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, afectando a parte o todo el pulmón
T2a	Tumor > 3 cm, pero ≤ 4 cm en su diámetro mayor
T2b	Tumor > 4 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor
T3	Tumor > 5 cm, pero ≤ 7 cm en su diámetro mayor o con nódulos tumorales en el mismo lóbulo que el tumor primario, o que invade directamente alguna de las

siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo pleura parietal y tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal.

T4 Tumor > 7 cm en su diámetro mayor o asociado a nódulos tumorales en distinto lóbulo ipsilateral al del tumor primario, o invade alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina.

N: afectación de ganglios linfáticos regionales

Nx	No se puede evaluar la afectación de los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe afectación de los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o hiliares e intrapulmonares ipsilaterales. Incluyendo afectación por extensión directa
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales

M: metástasis a distancia

M0	No existen metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia
M1a	Nódulos tumorales presentes en lóbulo contralateral, tumor con nódulos pleurales o pericárdicos, o derrame pleural o pericárdico malignos ^d
M1b	Metástasis única extratorácica ^e
M1c	Metástasis múltiples extratorácicas en uno o varios órganos

^a El infrecuente tumor de cualquier tamaño que invade superficialmente con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que puede extenderse proximalmente al bronquio principal, también es clasificado como T1a.

^b Adenocarcinoma solitario de ≤ 3 cm con un predominante componente lepidico y ≤ 5 mm de invasión en cualquier foco.

^c Los tumores T2 con estas características se clasifican como T2a si son de ≤ 4 cm en su diámetro mayor o si el tamaño no puede determinarse, y como T2b si son > 4 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor.

^d La mayoría de los derrames pleurales (pericárdicos) con cáncer de pulmón son debidos al tumor. En pocos pacientes, sin embargo, múltiples exámenes del líquido pleural (pericárdico) son negativos para células neoplásicas y el líquido no es hemático ni un exudado. Cuando estos aspectos y el juicio clínico concluyen que el derrame no se relaciona con el tumor, el derrame debería ser excluido como descriptor de estadificación.

^e Esto incluye la afectación de un ganglio no regional.

1.4.1 Determinación del tamaño tumoral (T)

El estadio T está determinado por el tamaño del tumor primario en el eje largo medido en la reconstrucción multiplanar y su afectación con las estructuras adyacentes. Para el estadio T, se analizó el pronóstico en pacientes con CPCNP, con o sin afectación ganglionar y sin enfermedad metastásica. Existen varias diferencias con respecto a la séptima edición, principalmente en cuanto al tamaño, distancia a la carina o la invasión de estructuras mediastínicas.

1.4.2 Descripción del estado ganglionar (N)

La estadificación ganglionar evalúa la carga tumoral en los ganglios hiliares y mediastínicos regionales. Las estaciones ganglionares han podido separar consistentemente a los pacientes en diferentes grupos de pronóstico y permanecen sin cambios con respecto a la edición anterior.

1.4.3 Definición de las metástasis (M)

La estadificación M se define por la presencia de metástasis más allá de los ganglios linfáticos regionales. El análisis validó la definición de enfermedad metastásica intratorácica de la séptima edición y, por lo tanto, se mantuvo esta definición. Destaca la diferenciación en metástasis extratorácicas, pasando de un M1b global a M1b en caso de oligometástasis, y M1c si existen varias lesiones metastásicas.

1.5 Inmunoterapia

Durante la última década, hemos asistido a una revolución de avances tanto en los métodos de detección y diagnóstico, como en el tratamiento del CPCNP. Una mayor y mejor comprensión de la biología del cáncer de pulmón ha llevado al desarrollo de múltiples terapias dirigidas eficaces contra dianas moleculares, agentes antiangiogénicos e inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI) (12), mejorando la supervivencia de estos pacientes.

Los anticuerpos específicos contra PD-1, PD-L1 y el receptor de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) tienen ya un papel protagonista en la estrategia terapéutica del CPCNP (13–21).

Aunque el desarrollo de los ICI comenzó en gran medida como monoterapia en el entorno de segunda línea, en la actualidad, con la excepción del CPCNP con alteración genómica con opción a terapia dirigida o cuando existe alguna contraindicación a su uso, la mayoría de los pacientes con CPCNP recibirán tratamiento con anti PD-1 o anti PD-L1 en primera línea de enfermedad metastásica, contando también con indicaciones en terapia de consolidación tras quimio-radioterapia en la enfermedad localmente avanzada irresecable y la terapia adyuvante tras la resección quirúrgica (22).

La utilidad de los ICI en el tratamiento del CPCP se ha establecido en primera línea en combinación con quimioterapia (23,24), con un impacto modesto en la supervivencia global (SG), en monoterapia, y recientemente en la enfermedad localizada como consolidación tras quimio-radioterapia (25).

La elección del tratamiento en la práctica clínica hoy en día está determinada en gran medida por la expresión de PD-L1, la carga de enfermedad y el perfil mutacional del tumor, todos ellos con limitaciones. Si bien la expresión de PD-L1 es el biomarcador más utilizado, su valor predictivo no es absoluto. La heterogeneidad intratumoral e intertumoral, una amplia variedad de ensayos y valores de corte utilizados para definir su positividad, y el efecto de la manipulación y el almacenamiento del tejido tumoral en el análisis de PD-L1 lo hacen un biomarcador imperfecto (26–29).

A pesar del papel cada vez mayor de la inmunoterapia y específicamente de la inhibición del punto de control de PD-1/PD-L1 en el cáncer de pulmón, y que ha supuesto una mejora significativa en la supervivencia de pacientes sin alteraciones genéticas que permitan un tratamiento dirigido (30), es importante destacar que un número elevado de pacientes no va a obtener beneficio de estas terapias (31).

La tolerancia global a estos tratamientos es mayoritariamente mejor que con la quimioterapia tradicional, si bien es cierto que es importante destacar los efectos adversos

inmunorrelacionados (irAEs) característicos de los ICI. Estos pueden alterar la calidad de vida, aumentar los costes de atención médica, provocar un deterioro grave o incluso la muerte de los pacientes.

La tasa global de respuesta a los ICI en el CPCNP es en torno al 15-20% y aún no se dispone de biomarcadores predictivos de respuesta (32). Por este motivo, es imperativo el desarrollo de biomarcadores predictivos clínicamente eficaces para seleccionar adecuadamente a los pacientes con mayor probabilidad de beneficio ante estas terapias y conocer en la medida de lo posible, a aquellos pacientes con baja posibilidad de respuesta y/o un mayor riesgo de toxicidad asociada. Figura 6. (33)

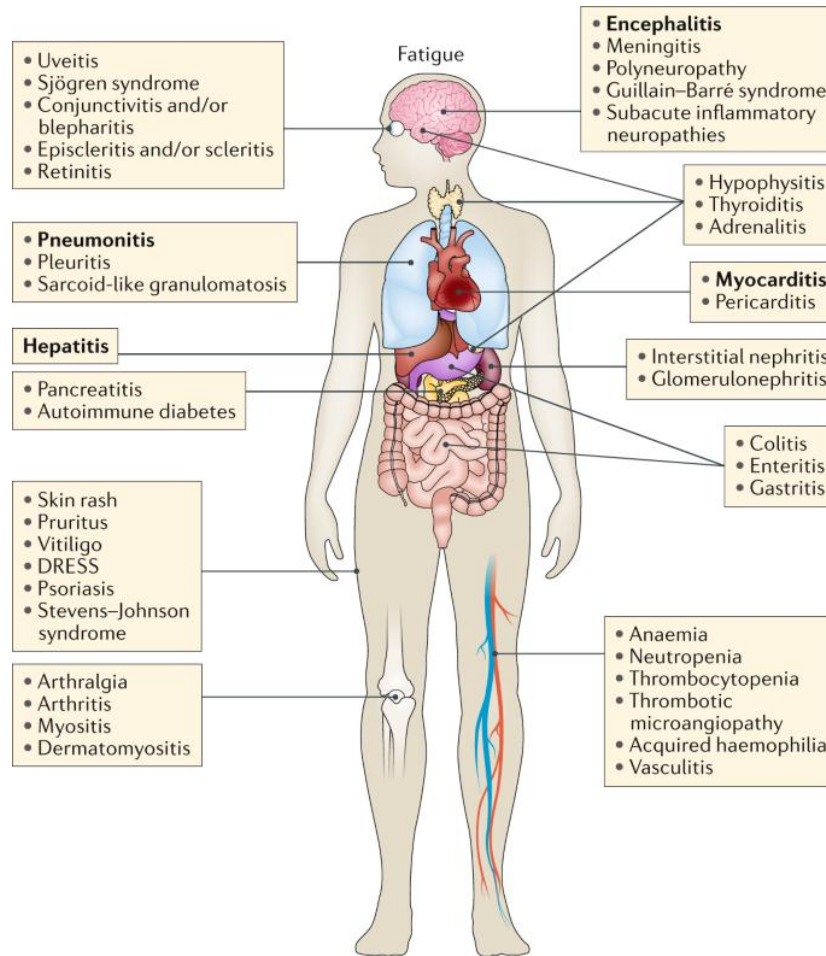


Figura 6. Principales efectos adversos inmunorrelacionados según órgano afecto. Ocular: uveítis, síndrome de Sjögren, conjuntivitis, blefaritis, epi/escleritis, retinitis. Pulmón: neumonitis, pleuritis, granulomatosis tipo sarcomatoide. Hígado: hepatitis. Páncreas: pancreatitis, diabetes autoinmune. Piel: erupción cutánea, prurito, vitíligo, exantema medicamentoso con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS), psoriasis, síndrome de Stevens-Johnson. Osteomuscular: artralgias, artritis, miositis, dermatomiositis. Neurológico: encefalitis, meningitis, polineuropatía, síndrome de Guillain-Barré, neuropatías inflamatorias subagudas. Endocrino: hipofisitis, tiroiditis, adrenalitis. Renal: nefritis intersticial, glomerulonefritis. Digestivo: colitis, enteritis, gastritis. Hematológico: anemia, neutropenia, trombocitopenia, microangiopatía trombótica, hemofilia adquirida, vasculitis.

1.5.1 Estadio III irresecable

El tratamiento del CPNCP estadio III varía según las características clínicas del paciente y la extensión del tumor, siendo un desafío debido a la naturaleza localmente avanzada de la enfermedad. El manejo depende predominantemente de la potencial resecabilidad del tumor, lo que influye de forma determinante en la estrategia terapéutica.

Con respecto al tratamiento del estadio III irresecable, (particularmente estadio IIIB y IIIC), la quimiorradioterapia concomitante es el tratamiento estándar de elección. Diversos estudios han demostrado que la administración simultánea de quimioterapia y radioterapia mejora la supervivencia en comparación con la administración secuencial. Los regímenes más comunes se basan en fármacos derivados de platino, como cisplatino o carboplatino en combinación principalmente con vinorelbina o etopósido (34,35).

La introducción de la inmunoterapia en el manejo de CPNCP localmente avanzado, estadio III irresecable significó un cambio en el estándar de tratamiento para estos pacientes (36). Se demostró que el uso de durvalumab, un inhibidor de PD-L1, administrado después de la quimiorradioterapia, mejora significativamente la supervivencia libre de progresión (SLP) y la SG en pacientes con enfermedad estable o en respuesta parcial tras la quimiorradioterapia.

1.5.2 Estadio IV

El tratamiento del CPNCP estadio IV sin alteración genómica accionable, está altamente influenciado por los niveles de expresión de PD-L1.

En pacientes con tumores que presentan una expresión de PD-L1 $\geq 50\%$, la monoterapia con inhibidores de PD-1/PD-L1 es el tratamiento de primera línea recomendado. Fármacos como pembrolizumab (37,38) y atezolizumab (39) han demostrado una mejora significativa en la SG y SLP en comparación con la quimioterapia tradicional, con tasas de respuesta objetiva (TRO) superiores al 40% en este subgrupo.

Para pacientes con expresión de PD-L1 entre el 1-49%, el esquema más recomendado es la combinación de inmunoterapia con quimioterapia. Se evaluó la administración de pembrolizumab más quimioterapia basada en platino (40), evidenciando beneficios en SG y SLP en pacientes con PD-L1 $< 50\%$, con una TRO de aproximadamente 48%. En pacientes con PD-L1 del 1-49%, esta combinación mejora los resultados frente a la quimioterapia en exclusiva.

En aquellos pacientes sin expresión de PD-L1 ($< 1\%$), la combinación de quimioterapia con inmunoterapia sigue siendo la estrategia estándar, dada la ausencia de beneficio significativo con la monoterapia inmunológica en este grupo. Se ha evaluado la administración de atezolizumab en combinación con quimioterapia y bevacizumab (41), mostrado mejoras en la SG, pero sin llegar a ser estadísticamente significativas, con una TRO del 60% en pacientes sin expresión de PD-L1.

1.6 Microbiota y cáncer

Los microorganismos se han estudiado clásicamente en relación con las enfermedades infecciosas, y principalmente mediante el uso de métodos de aislamiento y cultivo. Sin embargo, en la práctica, muchas bacterias son difíciles de aislar y cultivar y, por lo tanto, solo se ha estudiado un número limitado de ellas hasta la fecha.

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos que habitan en el cuerpo recubriendo epitelios y mucosas, y que establecen con nuestro organismo relaciones simbióticas (mutuo beneficio), comensales (beneficio neutro) o patogénicas (perjuicio para el hospedador). Estas poblaciones pueden ser estables (autóctonas) o transitorias (alóctonas) (42).

Por otro lado, el concepto de microbioma engloba a los microorganismos del hábitat, su contenido genético y las características ambientales. Es frecuente que los estudios sobre el microbioma se centren exclusivamente en el dominio Bacteria, sin embargo, se deberían tener en cuenta otros microorganismos tales como arqueas, hongos, helmintos, e incluso los virus tienen un papel relevante dentro del microbioma humano.

Dependiendo de la localización anatómica, la microbiota humana presenta una composición diferente. La más estudiada hasta el momento es la del tracto gastrointestinal, dada su elevada densidad de microorganismos (hasta 10^{14} células bacterianas por cada gramo de tejido), así como la facilidad de acceso a la misma a través de muestras fecales o biopsias. El colon llegaría a albergar aproximadamente el 70% de las bacterias de todo el cuerpo humano (43).

La microbiota intestinal humana representa 10 veces más que el total de células del huésped humano, manteniendo un microambiente dinámico, estable y saludable dentro del hospedador. En general, se consideran miembros comunes las bacterias de los filos Firmicutes (actualmente renombrado Bacillota), Bacteroidetes (actualmente renombrado Bacteroidota) y, en menor proporción, Proteobacteria (actualmente renombrado Pseudomonadota), Actinobacteria, Fusobacteria y Verrumicrobiota. Se mantiene nombre de acuerdo con la designación más común y familiar, en lugar de las últimas actualizaciones, para evitar confusión.

A partir de 2005, gracias al desarrollo de la tecnología NGS, se ha generalizado el análisis genómico de la microbiota. Como resultado, ha sido posible analizar los microbiomas del tracto respiratorio inferior, hasta ese momento considerado estéril, utilizando principalmente la secuenciación de ADN ribosómico (ADNr) de la subunidad 16S y el análisis metagenómico, revelando un microbioma con un alto nivel de biodiversidad (44).

La secuenciación de ADNr 16S es la técnica más amplia, rápida y rentable para caracterizar a nivel composicional comunidades bacterianas complejas, si bien no discrimina entre bacterias activas metabólicamente o inertes.

El objetivo de la secuenciación de amplicones es identificar los grupos microbianos presentes en dicha comunidad. El fundamento de la técnica se basa en la conservación de genes ribosomales a lo largo de la evolución y la existencia de regiones hipervariables que son una marca única de cada especie o grupo de organismos con relación filogenética.

En las bacterias, el gen conservado de manera universal es el 16S del ADN_r, cuyo transcrito forma parte de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano.

Cada vez es mayor la evidencia de que existe relación entre la microbiota intestinal y la pulmonar, definida como el eje intestino-pulmón (45). Numerosos estudios han demostrado que la microbiota intestinal no solo puede afectar la homeostasis pulmonar de diversas formas, condicionando una mayor susceptibilidad a las enfermedades pulmonares (46,47), sino que también podría mejorar la resistencia y la capacidad de recuperación pulmonar contra las enfermedades. Las variaciones en la composición de los microorganismos intestinales provocados por el medio ambiente, la dieta, diferentes enfermedades o intervenciones médicas, principalmente el uso de antibióticos, podrían también estar relacionados con cambios en la respuesta inmunitaria y la homeostasis de las vías respiratorias (48,49). Este desequilibrio se conoce como disbiosis intestinal (50).

Diversas enfermedades se desarrollan y empeoran en función del equilibrio de dicha microbiota. Investigaciones recientes sobre microbiota asociada con el cáncer plantean interacciones recíprocas entre bacterias, células tumorales e inmunitarias, las vías bacterianas asociadas con la inducción de la oncogénesis y su importancia traslacional (51).

Las bacterias pueden alterar el ciclo celular mediante la producción de toxinas, dando como resultado el crecimiento celular con alteraciones en la expresión de proteínas que controlan la reparación del ADN, la división celular y la apoptosis. Además, pueden alterar la respuesta inmunitaria del huésped contra las células malignas, y recientemente se ha demostrado una asociación entre la composición de la microbiota y la respuesta a la inmunoterapia. Los estudios en modelos animales indican que la microbiota puede modular la sensibilidad de los cánceres sólidos a los ICI, principalmente a terapias anti CTLA4 y PD-L1 (52). Es decir, la disbiosis intestinal provocaría una alteración de la homeostasis inmune intestinal, promoviendo el desarrollo de procesos inflamatorios e incluso tumorales (53,54).

Sin embargo, a pesar de la creciente evidencia que muestra que dicha disbiosis podría asociarse con la oncogénesis pulmonar, los mecanismos exactos aún no se han dilucidado por completo.

En los pacientes con cáncer colorrectal (CCR), la composición de la microbiota intestinal suele ser radicalmente diferente a la de los individuos sanos, por ejemplo, se ha visto un aumento de *Porphyromonas*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Peptostreptococcus* y disminución de *Roseburia* u otros microbios beneficiosos, como las bacterias productoras de butirato de la familia *Lachnospiraceae* (55). Mientras tanto, las proporciones relativas y la abundancia de los microorganismos residentes también pueden estar directamente asociadas con el cáncer, lo que también se ha informado en pacientes con CCR, como *Streptococcus bovis* biotipo I (56), *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis* que secretan toxinas nocivas para el ADN (57,58).

También se ha descrito que la microbiota intestinal puede alterar la actividad inmunitaria antitumoral y, por tanto, desempeñar un importante papel en la regulación de los mecanismos de respuesta y resistencia a la inmunoterapia en tumores malignos (59).

Varios estudios apoyan la hipótesis de que la diversidad de la microbiota intestinal en pacientes con cáncer de pulmón se correlaciona positivamente con la eficacia de la inmunoterapia (60,61). Incluso algunos estudios refieren que podría estar relacionada con una mayor SLP en pacientes con CPCNP (62). En otros, se ha mostrado una mayor concentración de *Akkermansia muciniphilia* en las heces de los respondedores a ICI (63).

Otros trabajos han analizado específicamente la microbiota pulmonar, y su relación con la inmunidad y la carcinogénesis en el cáncer de pulmón (64). Figura 7.

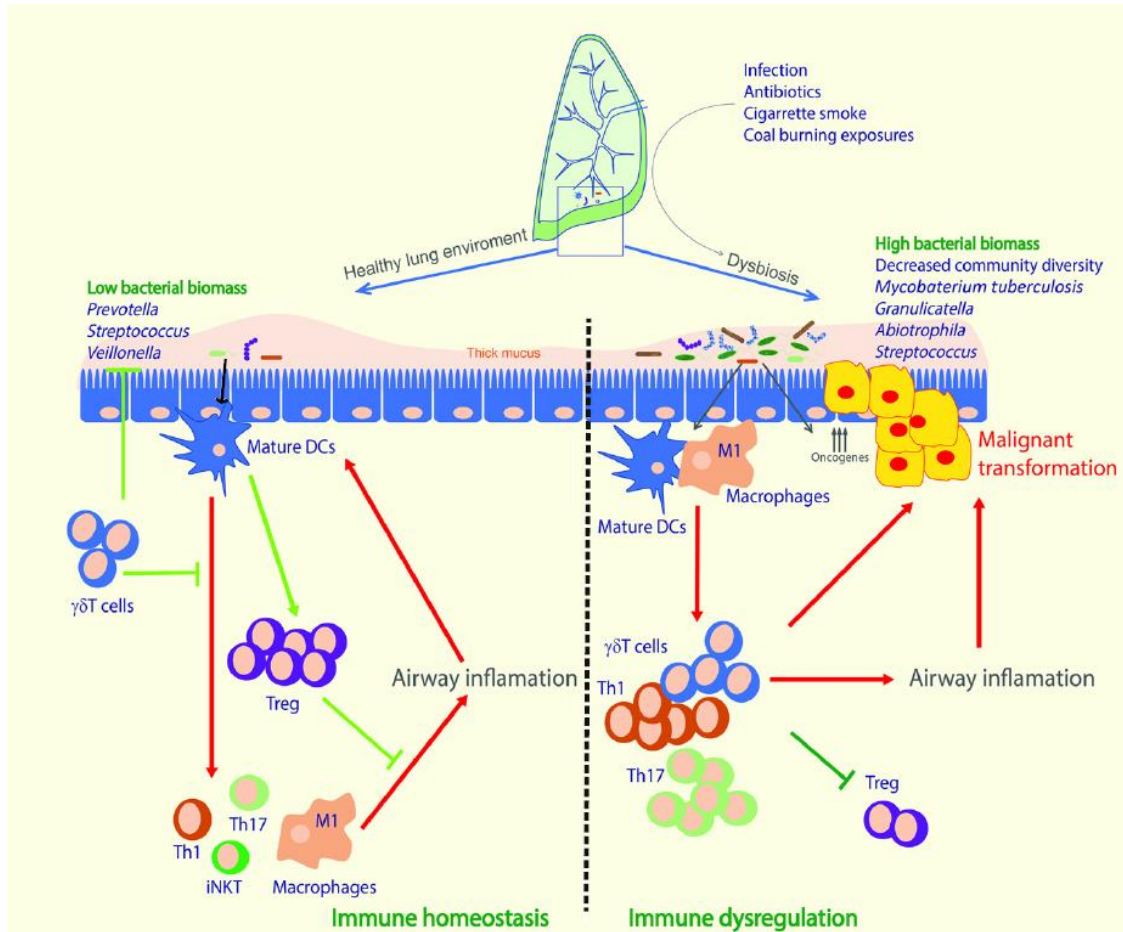


Figura 7. Relación entre la microbiota pulmonar, la homeostasis y el cáncer de pulmón. Existe un delicado equilibrio entre el sistema inmunitario y la microbiota. La microbiota comensal contribuye a la tolerancia inmunitaria, disminuyendo la inflamación pulmonar a través del reclutamiento de células dendríticas (CD), células T $\gamma\delta$ y células T reguladoras (Treg). Los macrófagos y las células T responden a la colonización microbiana y previenen la sobrecarga de patógenos o metabolitos (panel izquierdo). La microbiota pulmonar podría contribuir al desarrollo del cáncer de pulmón. Las bacterias podrían promover factores proinflamatorios, conduciendo a la inflamación crónica y la regulación positiva de las vías de señalización proliferativa en las células epiteliales de las vías respiratorias, lo que induce la transformación celular y la tumorigénesis (panel derecho). Además, algunos componentes microbianos podrían afectar directamente las vías protumorigénicas en las células epiteliales (oncogenes). Abreviaturas: célula iNKT, célula asesina natural invariante; Th1/17, tipo de célula T colaboradora 1/17.

El posible aumento del riesgo de cáncer de pulmón debido a cambios en la microbiota podría estar relacionado con una inmunidad hiperactiva que conduciría a una inflamación crónica, como se describe en la sección anterior (Figura 7), o bien con mecanismos de inmunovigilancia defectuosos (Figura 8).

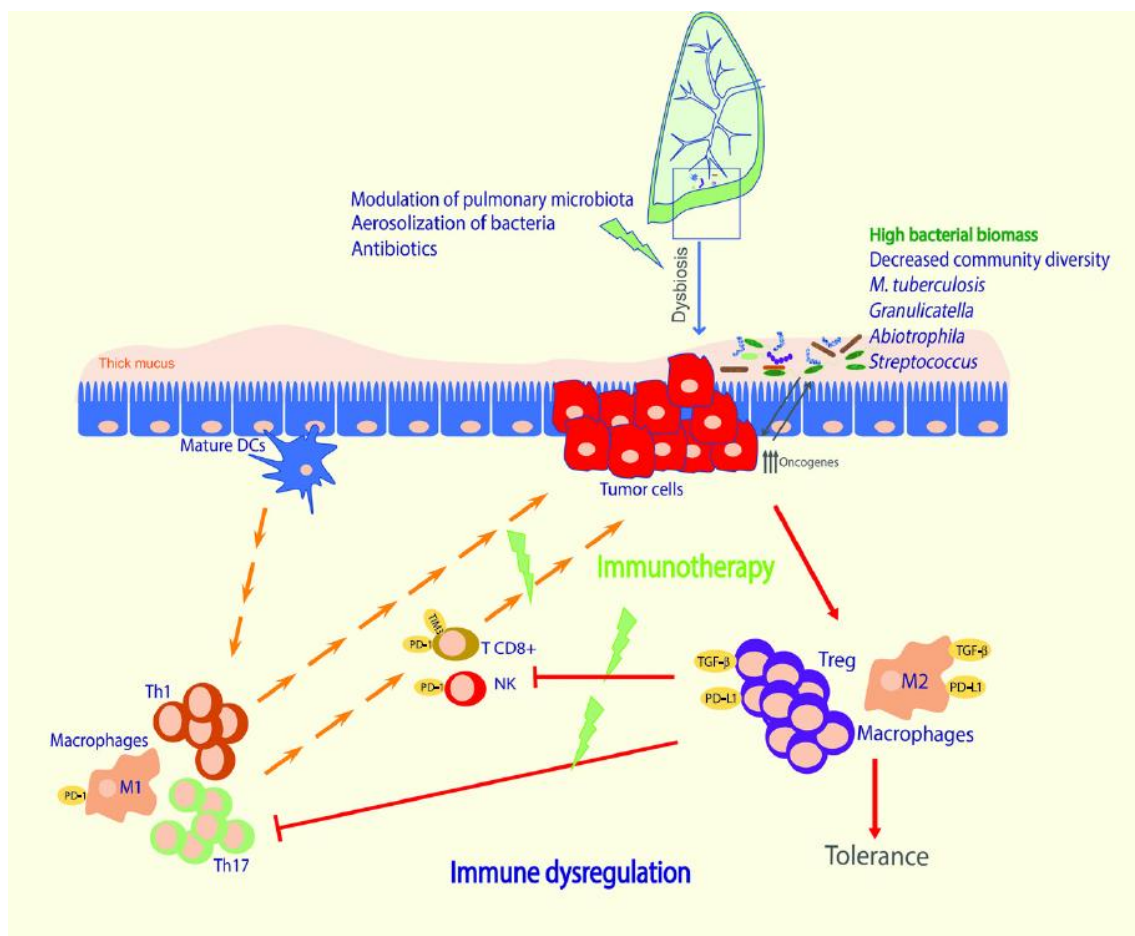


Figura 8. Posibles enfoques inmunomoduladores para revertir el microambiente inmunitario protumoral debido a la disbiosis de la microbiota pulmonar.

Líneas rojas: El desarrollo tumoral configura un microambiente inmunosupresor enriquecido en células T reguladoras (Treg) y macrófagos M2 que expresan moléculas antiinflamatorias como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1), la proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4) o el factor de crecimiento transformante TGF-β. Estos factores inhiben las respuestas antitumorales de las células T y las células asesinas naturales (NK), promoviendo la tolerancia y la evasión inmunitaria tumoral. La disbiosis de la microbiota pulmonar y la presencia de cepas bacterianas específicas podrían contribuir a la generación de este microambiente inmunosupresor y a la baja eficacia de los tratamientos de inmunoterapia.

Flechas verdes: los tratamientos de inmunoterapia, como los inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICI), en combinación con estrategias para modular la microbiota pulmonar (aerosoles bacterianos o tratamientos antibióticos selectivos) podrían ayudar a revertir la disbiosis y mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales del huésped. Abreviaturas: DC, células dendríticas; PD-1, muerte celular programada-1.

1.7 Metabolitos: ácidos grasos de cadena corta

El microbioma intestinal es un ecosistema microbiano que tiene diversos efectos sobre las funciones fisiológicas del huésped, en particular en el desarrollo y la actividad inmunitaria.

La base molecular de las interacciones entre el huésped y el microbioma se está comenzando a descubrir y está mediada tanto por las interacciones intercelulares como por la producción, modificación y detección de una gran variedad de pequeñas moléculas bioactivas, denominadas metabolitos.

Muchos metabolitos gastrointestinales se originan a partir de fuentes dietéticas o ambientales. Se encuentran con el microbioma intestinal como parte del proceso de digestión y tránsito intestinal, y vinculan la nutrición del huésped con la fisiología, incluyendo el desarrollo y la función inmunitaria. Otros metabolitos son producidos o modificados endógenamente a través de diversos procesos metabólicos, por el huésped o por su microbiota (65). En conjunto, se estima que más del 50% de los metabolitos fecales y urinarios derivan del microbioma intestinal o son modificados por él (66).

Algunos de los metabolitos asociados al microbioma son bioactivos y afectan a los procesos celulares del huésped, incluida la diferenciación, la migración, la proliferación y la apoptosis, presentando efectos fisiológicos o patofisiológicos en el huésped.

Las interacciones dinámicas entre la microbiota intestinal y los sistemas inmunológicos innato y adaptativo del huésped desempeñan funciones clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la inhibición de la inflamación. La microbiota intestinal metaboliza proteínas y carbohidratos complejos, sintetiza vitaminas y produce una enorme cantidad de productos metabólicos que pueden mediar en la interacción entre las células epiteliales intestinales e inmunitarias.

El huésped ha desarrollado múltiples plataformas de detección de metabolitos y vías de señalización inmunitaria descendentes que confieren reactividad a los metabolitos modulados por el microbioma (67,68). Estas plataformas de detección se expresan en diferentes combinaciones en subconjuntos celulares de la mucosa, como células epiteliales intestinales, macrófagos, células dendríticas, células T y células linfoides innatas, donde desempeñan funciones críticas en la comunicación mutua entre el huésped y el microbioma. Además de los efectos locales de los metabolitos en la función inmunitaria de la mucosa gastrointestinal, muchos metabolitos son absorbidos sistémicamente y pueden llegar a órganos remotos y modular las respuestas inmunitarias en otras regiones del huésped.

Como tal, los metabolitos pueden proporcionar un eslabón perdido entre la configuración funcional y compositiva del microbioma intestinal y sus efectos remotos en la fisiología del huésped, así como modificar el riesgo de enfermedad en órganos aparentemente no relacionados.

Las células epiteliales intestinales producen una barrera mucosa como mecanismo de defensa, para segregar la microbiota de las células inmunes del huésped y reducir la permeabilidad intestinal. Una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el sistema inmunológico de las mucosas puede provocar una mayor abundancia de bacterias

gramnegativas potencialmente patógenas y sus cambios metabólicos asociados, alterando la barrera epitelial. La disbiosis intestinal, o alteraciones negativas en la composición microbiana intestinal, también pueden desregular la respuesta inmunitaria, provocando inflamación, estrés oxidativo y resistencia a la insulina. Con el tiempo, la disbiosis crónica y la translocación bacteriana y de sus productos metabólicos a través de la barrera mucosa puede aumentar la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades autoinmunes y una variedad de neoplasias malignas (69).

1.7.1 Modulación de la configuración de metabolitos gastrointestinales por parte del microbioma

Una de las funciones esenciales que desempeña la microbiota intestinal es la modulación de los metabolitos gastrointestinales, incluyendo su síntesis, digestión, fermentación y metabolismo secundario. Se ha demostrado que varias taxonomías microbianas comensales, incluidas Enterobacteriaceae, Enterococcus spp. y Lactobacillus spp., influyen en las concentraciones de los metabolitos gastrointestinales (70) mediante procesos que abarcan desde la utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno hasta la generación de metabolitos secundarios como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (71).

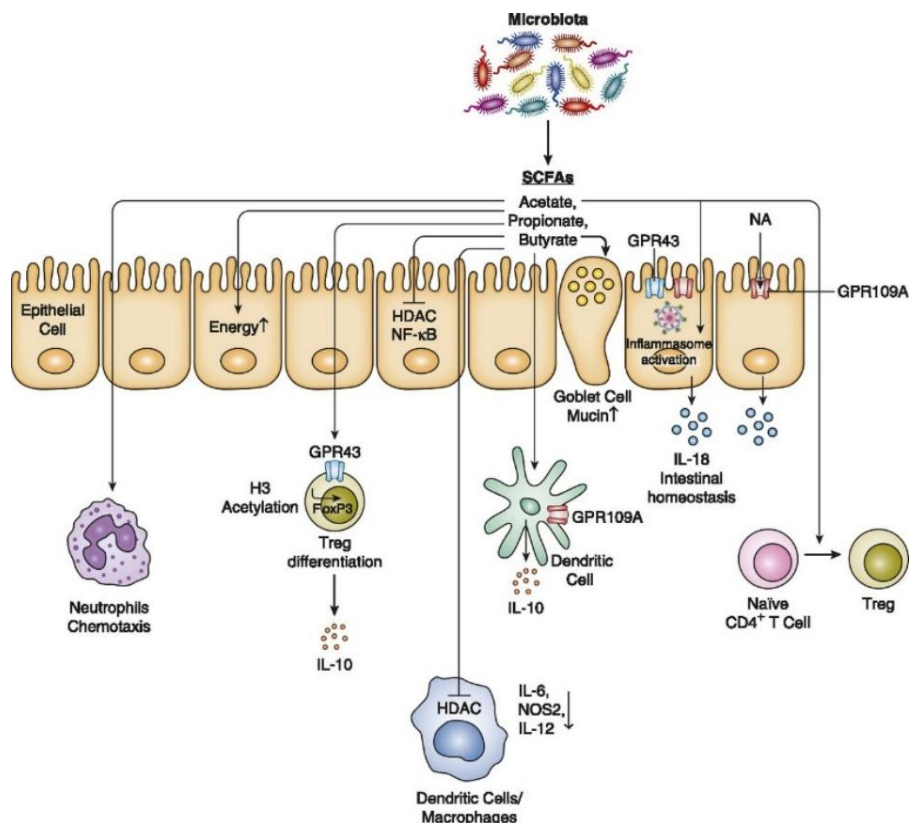


Figura 9. Los metabolitos asociados a la microbiota participan en una red compleja de comunicación entre el huésped y el microbioma, modificando la respuesta inmunitaria. Se sugiere que los metabolitos más estudiados, AGCC, afectan múltiples facetas de la respuesta inmunitaria, como la función de los macrófagos y las células dendríticas, la secreción de citocinas, la diferenciación de las células Treg, la secreción de mucina de las células caliciformes intestinales,

la activación de IL-18 mediada por el inflamasoma y la quimiotaxis de los neutrófilos a través de la vía NF- κ B.

1.7.2 Producción de metabolitos de novo en el microbioma

La microbiota intestinal produce una serie de metabolitos, algunos de los cuales presentan funciones bioactivas específicas en el huésped. Un excelente ejemplo de estos metabolitos sintetizados de novo son los AGCC, que son productos de la fermentación microbiana de fibras nutricionales no digeribles, e incluyen acetato (C2), propionato (C3) y butirato (C4), entre otros.

Las bacterias comensales intestinales, como las que pertenecen a los géneros *Butyrivibrio*, *Clostridium* y *Eubacterium*, pueden producir AGCC que alcanzan localmente una concentración milimolar (72). Durante su producción también se generan otros subproductos de la fermentación, como el succinato y el lactato, que la microbiota utiliza para su mantenimiento y supervivencia (73).

Los AGCC, a su vez, median una serie de funciones importantes para el huésped eucariota, incluido el uso como fuente de energía por parte de las células epiteliales intestinales y una variedad de propiedades antiinflamatorias en las células T, las células T reguladoras (Tregs), los neutrófilos y los macrófagos, donde afectan la migración, la actividad citolítica, la producción de citocinas y la regulación epigenética de la expresión génica.

1.7.3 Reprogramación metabólica de las células inmunitarias.

Una de las funciones de la microbiota comensal es proporcionar energía a las células epiteliales intestinales (CEI), a través de la fermentación de las fibras dietéticas por degradación de los carbohidratos complejos no digeridos en AGCC. En ausencia de la microbiota y los AGCC asociados, los ratones libres de gérmenes presentan un metabolismo energético alterado caracterizado por la fermentación preferencial de la glucosa en lactato (74), conduciendo a una mayor autofagia de las CEI como consecuencia de la inanición de nutrientes (75,76). La monoinoculación de ratones libres de gérmenes con *Butyrivibrio fibrisolvens*, productor de butirato, rescató a las CEI de la autofagia y de la insuficiencia de la respiración mitocondrial (75).

Los mecanismos moleculares por los cuales los AGCC, como el butirato, sirven como fuentes de energía y moduladores funcionales consecuentes de las células epiteliales intestinales y las células inmunes se están comenzando a descubrir.

El butirato actúa como un sustrato local para la producción de energía a través del ciclo del ácido tricarboxílico, la generación de ATP y la β -oxidación, así como a través de la supresión de la autofagia en las células epiteliales intestinales (75).

Además de su efecto proliferativo en los enterocitos sanos, el butirato también inhibe la proliferación de células cancerosas. El efecto antineoplásico del butirato está asociado con su efecto inhibitorio sobre las enzimas histona deacetilasa (HDAC), promotoras de la carcinogénesis. Debido al cambio metabólico de las células cancerosas hacia la

glucólisis, el butirato no utilizado se acumula e inhibe las HDAC favorecedoras de la carcinogénesis (77). Los inhibidores de HDAC pueden inhibir directamente la proliferación de células tumorales al inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis a través de efectos epigenéticos sobre la expresión genética e interferir con la quimiotaxis de las células T en el microambiente del tumor. Muchos estudios han observado que las HDAC son inhibidas por los AGCC, principalmente propionato y butirato, lo que conlleva la supresión de las respuestas inflamatorias en células inmunitarias y el desarrollo tumoral (78).

1.7.4 Modulación transcripcional y epigenética de genes relacionados con el sistema inmunitario

Otro mecanismo clave por el cual los metabolitos modulados por el microbioma intestinal influyen en la respuesta inmunitaria implica la regulación de la programación transcripcional de las células inmunitarias a través del impacto epigenético.

Un ejemplo sería la transcripción de genes relacionados con la mucina por el butirato, contribuyendo así a la diferenciación de las células caliciformes y a la producción de moco (79,80), esenciales en la defensa inmunitaria innata del huésped contra los patógenos invasores. Figura 10 (81).

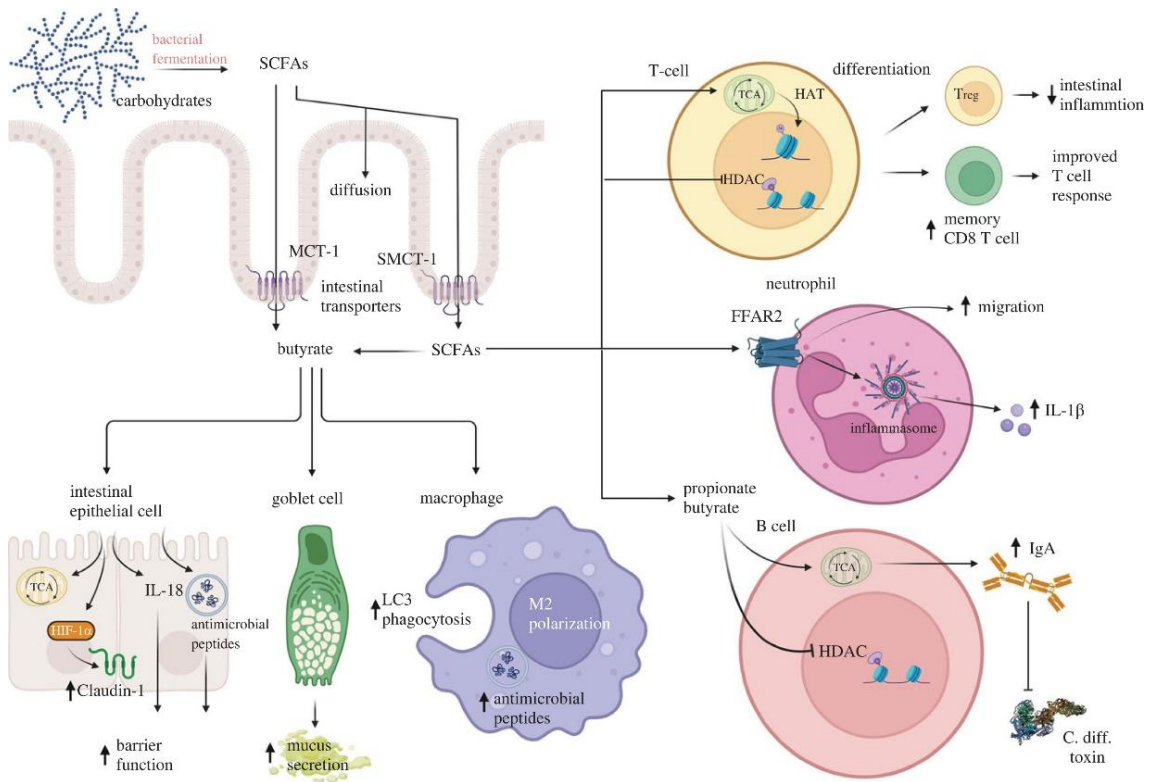


Figura 10. Resumen de las diferentes funciones de los AGCC en las células epiteliales intestinales y las células inmunes periféricas y residentes en los tejidos del intestino.

Los AGCC son moduladores centrales de la respuesta inmune de las mucosas. Se producen por la fermentación de bacterias comensales en el intestino y pueden difundir pasivamente o ser transportados activamente por MCT-1 o SMCT-1 a través de la barrera intestinal. Actúan como fuente de energía para las células epiteliales intestinales, contribuyen a mantener la función de la

barrera intestinal al regular positivamente la expresión de Claudin-1, estimulan la secreción de moco e inducen la polarización de los macrófagos M2 con un aumento de la fagocitosis de LC3 para proteger contra los patógenos invasores. Sus efectos sobre las células inmunes periféricas incluyen la estimulación de la diferenciación de Treg, el aumento de la migración de neutrófilos a los sitios de inflamación, la inducción del cambio de clase de anticuerpos de las células B y la secreción de anticuerpos contra toxinas.

Además, la actividad inhibidora de las HDAC del butirato induce cambios en la expresión génica en las células dendríticas, incluida la supresión de IL-12, IL-6 y Relb, contribuyendo a la diferenciación de las células Treg (82).

El butirato también modula la respuesta inmunitaria en los macrófagos, ya que inhibe la transcripción de mediadores proinflamatorios en los macrófagos de la lámina propia del colon, como IL-6, Nos2 e IL-12, contribuyendo al mantenimiento de la tolerancia hacia las bacterias comensales.

Además de sus posibles efectos sobre el metabolismo celular, se ha demostrado que el butirato también influye en las células Treg periféricas a través de una mayor acetilación de la histona H3 de la región promotora Foxp3, asociada con la expresión génica (83), y suprime indirectamente la inflamación colónica a través de la regulación de la diferenciación de las células Treg mediada por el receptor GPR109A (84).

Además de ser el receptor del butirato, GPR109A también es el receptor del ácido nicotínico de origen microbiano (NA o niacina). El butirato y el NA de origen microbiano interactúan con GPR109A en las células epiteliales, los macrófagos y las células dendríticas y desencadenan la secreción de IL-18 de las células epiteliales y de IL-10 de las células dendríticas y los macrófagos, lo que conduce a una supresión adicional de la inflamación, ya que la IL-10 favorece el desarrollo de células Treg a partir de células CD4+.

La actividad supresora epigenética de los AGCC puede ser transferible verticalmente a la descendencia, ya que la alimentación rica en fibra de ratones hembra embarazadas suprimió la expresión de genes relacionados con la respuesta de las vías respiratorias en el pulmón fetal (85).

También se ha sugerido que los AGCC pueden influir en la función de los leucocitos y la quimiotaxis de los neutrófilos (86), a través de la inhibición de la actividad de HDAC que conduce a la inactivación de NF- κ B y la supresión de las citocinas proinflamatorias y el óxido nítrico.

1.7.5 Evidencia del estudio de AGCC en pacientes con CCR

Se ha señalado la posible contribución de la microbiota intestinal tanto en la respuesta como en la toxicidad del tratamiento con ICI (87).

Evidencia emergente sugiere que la disbiosis de la microbiota intestinal puede influir en la eficacia de los fármacos en pacientes con CCR durante el tratamiento del cáncer al modular el metabolismo farmacológico y la respuesta inmune del huésped. Dado que el

ecosistema intestinal mantiene un diálogo continuo con el sistema inmunológico, podría limitar la eficacia de los ICI debido al consumo competitivo de recursos (88).

Investigaciones recientes se han centrado en el estudio de los metabolitos microbianos, principalmente los AGCC, ya que pueden inducir directamente la apoptosis celular (89–91); sin embargo, aún no se han establecido valores normales para los AGCC, y sólo se han explorado las diferencias entre pacientes y controles o entre respondedores y no respondedores a ICI (92).

Se han realizado varios estudios en pacientes con CCR tratados con quimioradioterapia neoadyuvante. Los pacientes que respondieron al tratamiento (R), presentaban una mayor diversidad en su microbiota intestinal, así como un enriquecimiento en bacterias productoras de butirato, con niveles significativamente más altos de ácidos acético, butírico, isobutírico y hexanoico que los pacientes no respondedores (NR). Además, se observaron niveles más altos de zonulina en los NR y su microbiota contenía una mayor abundancia de especies proinflamatorias (93).

Otro estudio describió que los pacientes NR tenían niveles significativamente más altos de algunos derivados acetilados de poliaminas y zonulina sérica y niveles significativamente más bajos de heces de ácidos acético, butírico, isobutírico y hexanoico que los pacientes R. Estos metabolitos derivados de microorganismos son factores importantes que conectan la microbiota intestinal con el CCR y podrían ser responsables de la eficiencia del tratamiento oncológico.

Estos resultados sugieren que la microbiota intestinal y los AGCC pueden tener un papel importante en la respuesta a las terapias contra el cáncer.

1.8 Permeabilidad de la barrera intestinal

La microbiota intestinal y pulmonar están relacionadas gracias a un complejo eje bidireccional a través de la circulación sanguínea y linfática, lo que podría explicar el motivo por el que los cambios en un compartimento mucoso pueden afectar a otro distante (94).

La mucosa intestinal está formada por una capa de células epiteliales columnares polarizadas junto a una región subepitelial que contiene la lámina propia, el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y las capas musculares. Sobre las células columnares se encuentra la capa de moco. El moco normal está compuesto en un 98% por agua, siendo el resto proteínas glicosiladas (mucinas) y glicolípidos. En el colon, el moco tiene una capa externa, densamente colonizada por bacterias, hongos, virus y capaz de retener toxinas y alérgenos, y una capa interna mayoritariamente estéril donde están presentes inmunoglobulinas (principalmente IgA secretoras) y defensinas como la lisozima. La capa interna de moco es densa y está adherida a un espesor de ~50 μm y la capa externa está suelta y no está adherida y tiene un espesor de aproximadamente 100 μm . El intestino delgado tiene una sola capa de moco, que es mucho más delgada que la capa de moco del intestino grueso. La lámina propia incluye un tejido linfoide difuso constituido por macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos de la lámina propia, MC, eosinófilos y, ocasionalmente, neutrófilos.

La permeabilidad de las barreras epiteliales, como las del tracto intestinal y respiratorio, está estrechamente relacionada con el contenido luminal y la interacción con la microbiota. La permeabilidad depende del complejo de unión entre los enterocitos intestinales, que incluye proteínas de unión estrecha que son las reguladoras del transporte de iones y agua entre la luz intestinal y el torrente sanguíneo. Generalmente, se determina midiendo los niveles plasmáticos de citrulina, zonulina y endotoxinas (95). El aumento de la permeabilidad intestinal favorece el paso de antígenos a la lámina propia y al torrente sanguíneo, facilitando la respuesta inmunitaria inflamatoria local y sistémica, pudiendo afectar órganos y tejidos distantes (96). Figura 11 (97).

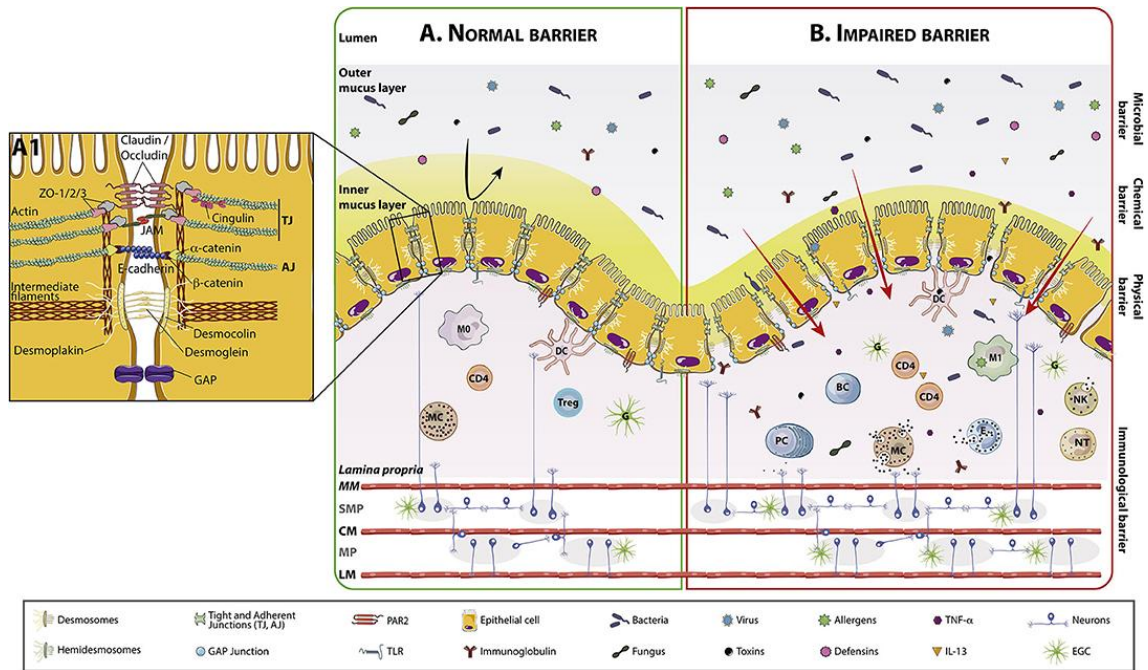


Figura 11. Anatomía de la barrera intestinal y sus componentes en condiciones normales y deterioradas.

(A) La barrera intestinal en homeostasis, donde las células están estrechamente unidas por uniones intercelulares (TJ, uniones adherentes, desmosomas y uniones GAP) representadas en detalle en (A1).

(B) Barrera intestinal alterada, con aumento del paso transcelular y paracelular del contenido del lumen. Este aumento del transporte activa el sistema inmunológico y el reclutamiento y desgranulación celular en la lámina propia. MC y PC son capaces de modular el ENS interactuando con neuronas SMP/MP y con EGC.

(A1) Representación de las uniones intercelulares. Son las principales responsables de la absorción de nutrientes y la secreción de agua y cloruro. Los complejos de unión intercelular, que incluyen uniones T, uniones adherentes, uniones gap y desmosomas, son estructuras dinámicas que restringen el paso de moléculas: de 4 a 5 Å en la punta de la vellosidad a más de 20 Å en la base de la cripta en el intestino delgado. La integridad y la estructura de las células epiteliales están moduladas principalmente por el citoesqueleto, principalmente por actina, miosina y filamentos intermedios. Las células se adhieren a la membrana basal a través de hemidesmosomas. Las uniones T se componen principalmente de CLDN, OCLN y proteínas JAM, que están conectadas a través de la zónula ocludens y la cingulina al citoesqueleto. Las uniones adherentes incluyen cadherinas como la E-cadherina, que se une a las cateninas (α y β) conectadas al citoesqueleto. Los desmosomas se componen principalmente de desmocolina y

desmogleína, que interactúan con la desmoplaquina, a su vez conectada a los filamentos intermedios.

AJ, Uniones adherentes; BC, Célula B; CD4, Linfocito T colaborador CD4+; CLDN, Claudina; CM, Músculo circular; D, Desmosomas; DC, Célula dendrítica; EGC, Célula glial entérica; ENS, Sistema nervioso entérico; IL-13, Interleucina 13; JAM, Molécula de adhesión de unión; LM, Músculo longitudinal; M0, Macrófagos tipo 0; M1, Macrófagos tipo 1; MC, Mastocitos; MM, Muscularis mucosae; MP, Plexo mientérico; NK, Asesina natural; NT, Neutrófilo; OCLN, Ocludina; PC, Célula plasmática; SMP, Plexo submucoso; TJ, Uniones estrechas; TNF- α , Factor de necrosis tumoral alfa; Treg, linfocito T regulador.

1.8.1 Citrulina y anticuerpos anticitrulina

La citrulina plasmática es un aminoácido producido casi exclusivamente por los enterocitos de la mucosa del intestino delgado (98). Las concentraciones plasmáticas de citrulina sérica varían entre 20 y 60 $\mu\text{mol/L}$ (litro), considerándose como valor medio 40 $\mu\text{mol/L}$. Sus concentraciones son independientes del estado nutricional y del metabolismo hepático. Es un marcador validado de función enterocitaria, de la barrera intestinal y su permeabilidad. Su valor disminuye en condiciones que causan una reducción de la masa de enterocitos, como el síndrome del intestino corto o enfermedades de atrofia de las vellosidades (99). En algunos estudios, parece que los niveles de citrulina se pueden ver afectados por el uso de antibióticos y podrían correlacionarse con la respuesta a la inmunoterapia (62,100), otros han demostrado una correlación entre los niveles de citrulina y la respuesta a ICI (100,101).

La citrulina se puede producir como resultado de una modificación posterior a la transducción de la arginina en una reacción catalizada por la peptidil-arginina desaminasa. Esta modificación se produce en los procesos inflamatorios y de muerte celular. En esta situación, la citrulina puede ser reconocida de forma aberrante por el sistema inmunitario, desencadenando la generación de anticuerpos anticitrulina. En algunas circunstancias, como infecciones y uso de antibióticos en pacientes con cáncer de pulmón en tratamiento con ICI, pueden producirse fenómenos inflamatorios y de muerte celular que provoquen un reconocimiento aberrante de la citrulina y la generación de anticuerpos anticitrulina.

1.8.2 Zonulina

La zonulina es una proteína reguladora de la permeabilidad de las uniones estrechas intestinales y su único regulador fisiológico conocido hasta el momento. Su presencia en el suero se ha propuesto como posible marcador periférico para la evaluación de la permeabilidad intestinal (102), como un mecanismo defensivo que contribuye a la respuesta inmune innata del huésped contra los cambios en el ecosistema del microbioma (103). La pérdida de la función de barrera puede, por tanto, sospecharse por una regulación positiva de zonulina (96,104). Es importante tener en cuenta que la detección de zonulina en suero puede verse afectada por fallos técnicos y, por lo tanto, debería confirmarse su valor en caso de querer monitorizar la permeabilidad de la barrera epitelial (105).

1.8.3 Endotoxina

La endotoxina generalmente hace referencia al lipopolisacárido (LPS) que forma parte de la membrana de las bacterias Gram negativas. Su detección en plasma ha sido estudiada, ya que cuando estas bacterias son lisadas en la luz intestinal, el LPS pasa al torrente sanguíneo. Normalmente las concentraciones de esta sustancia en sangre son bajas, pero parecen verse elevadas cuando existe una alteración de la permeabilidad intestinal. La fuerte antigenicidad de esta molécula suele desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica por medio de la activación de los receptores de tipo “toll”, favoreciendo una respuesta inflamatoria sistémica que puede modular la respuesta ICI. Por estos motivos, la endotoxina se postula como posible marcador de permeabilidad que relaciona el estado de la microbiota, con el estado inflamatorio del paciente (106,107).

La identificación de potenciales marcadores circulantes de la integridad de la barrera epitelial podría ser muy útil para monitorizar la progresión del cáncer y la eficacia del tratamiento (100). Sin embargo, hoy en día, aún existen muchas incógnitas sobre el papel de estos componentes, su relación con la microbiota y con la respuesta a la inmunoterapia.

2. Hipótesis y objetivos

La inmunoterapia es un tratamiento eficaz en el CPCNP localmente avanzado y en enfermedad metastásica. Sin embargo, aun desconocemos la mejor forma de seleccionar a los pacientes que más se beneficiarán de esta terapia, ya que actualmente incluso el biomarcador con mayor utilidad clínica para los ICI, la expresión de PDL1, no resulta ser perfecto ni efectivo.

Se plantea este estudio para la identificación y análisis de posibles marcadores de respuesta y toxicidad al tratamiento con CPCNP, con determinaciones en sangre y en heces incluyendo la microbiota intestinal, los AGCC en heces y los factores de permeabilidad intestinal.

La microbiota humana está presente en prácticamente cualquier localización de nuestro organismo y son múltiples las enfermedades, entre ellas el cáncer, en las que se producen cambios significativos en la misma. La microbiota intestinal podría modular la inmunidad del paciente con cáncer y, por tanto, afectar a la eficacia del tratamiento con ICI.

En lo relativo a los AGCC en heces, cada vez es mayor la evidencia de su potencial influencia en la eficacia y toxicidad de los ICI en el CPCNP, pudiendo algunos de ellos como el butirato, reforzar la función de las células T CD8+ y aumentar la producción de citocinas antitumorales, favoreciendo la respuesta al tratamiento. El análisis de estos metabolitos podría ofrecer nuevas oportunidades para personalizar y mejorar la eficacia del tratamiento, así como mitigar la toxicidad asociada.

Con respecto a la permeabilidad intestinal, destaca que los niveles de citrulina en plasma parecen correlacionarse de forma directa con la respuesta favorable a la inmunoterapia; por contra, el tratamiento antibiótico precoz determina niveles plasmáticos más bajos y se correlaciona con peor respuesta a ICI. Pudiendo ser así mismo de interés, evaluar la presencia de los anticuerpos anti-citrulina. La zonulina y endotoxina se relacionan

directamente con la permeabilidad de la barrera intestinal y su determinación también tiene interés en relación con la actividad de los ICI.

2.1 Objetivo principal

- Analizar de forma prospectiva en una cohorte de pacientes con CPCNP estadio III irresecable o estadio IV, en la que todos reciben tratamiento con ICI, si la combinación de la composición de la microbiota intestinal, los factores de permeabilidad de membrana intestinal, y los AGCC en heces, pueden predecir la eficacia y/o toxicidad del tratamiento con inmunoterapia.

2.2 Objetivos secundarios

- Analizar la aparición de toxicidad inmunorrelacionada y la respuesta al tratamiento con ICI.
- Estudiar la correlación entre la microbiota intestinal en pacientes con cáncer de pulmón que reciben tratamiento con ICI y su respuesta al tratamiento.
- Estudiar la correlación entre la microbiota intestinal en pacientes con cáncer de pulmón que reciben tratamiento con ICI y desarrollo de irAEs.
- Analizar la presencia global de los AGCC en heces, su distribución y relación con la respuesta al tratamiento con ICI.
- Analizar la presencia global de los AGCC en heces, su distribución y relación con el desarrollo de irAEs.
- Analizar la relación existente entre los niveles de citrulina, anticuerpos anticitrulina, zonulina y endotoxina en sangre periférica y la respuesta al tratamiento con ICI.
- Analizar la relación existente entre los niveles de citrulina, anticuerpos anticitrulina, zonulina y endotoxina en sangre periférica y el desarrollo de irAEs.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño del estudio

Estudio prospectivo, longitudinal, no intervencionista/observacional y unicéntrico, realizado en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB), hospital de tercer nivel, en Zaragoza, España.

3.2 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión fueron:

- Diagnóstico de CPNCP estadio III irresecable o IV, (tumor *de novo*, o tras resistencia o recurrencia a un tratamiento diferente a un ICI).
- Candidatos a tratamiento con ICI (inhibidores PD1 / PD-L1 / CTLA-4).

- No haber sido tratados previamente con ningún ICI.
- Firma de Consentimiento Informado para participar en este proyecto.

3.3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron:

- Histología distinta del CPNCP.
- Tumor concomitante de otro origen.
- Trastornos autoinmunes que contraindicaran tratamiento con ICI.
- Inmunoterapia previa para este tumor o cualquier otro motivo.
- Puntuación de grado 2 o superior en la escala del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG).
- Pacientes en tratamiento con corticosteroides con dosis superiores a 10 mg/24 h de prednisona o equivalente.
- Pacientes con inmunodeficiencias conocidas (incluida la infección por virus de la inmunodeficiencia humana).

3.4 Variables y estudio descriptivo

Las variables clínicas y antropométricas de los pacientes se recogieron del expediente clínico y se almacenaron en una base de datos codificada.

3.4.1 Estudio descriptivo

Se incluyeron un total de 55 pacientes, de los cuales 39 eran hombres y 16 mujeres. 54 de raza caucásica y uno hispanoamericano.

Las edades al inicio del tratamiento con ICI se comprendían entre 45 y 83, con una mediana de 63 años.

Con respecto al índice de masa corporal, el 84% presentaba un IMC $<30\text{kg}/\text{m}^2$, y el 16% restante, $\geq 30\text{kg}/\text{m}^2$.

La capacidad funcional se definió mediante la escala ECOG validada (108), siendo el grado 0 capacidad normal y el grado 4 el encamamiento el 100% del día. El 65.5% de los pacientes presentaba ECOG 0, y el 34.5% ECOG 1.

El 96.4% de los pacientes era fumador activo o exfumador, frente al 3.6% de nunca fumadores.

En lo referente a la histología, 22 pacientes fueron diagnosticados de carcinoma escamoso, y 33 de adenocarcinoma.

El estadio del tumor se definió según los grados establecidos por el octavo consenso TNM para el cáncer de pulmón (8). Se incluyeron 14 pacientes estadio III, y 41 pacientes estadio IV.

3.4.2 Tratamiento

La pauta de tratamiento con ICI se eligió según criterio del médico responsable del paciente en base a las guías de práctica clínica vigentes en ese momento (109–111). Tabla 3.

El seguimiento clínico se realizó cada 2-3 semanas durante la administración del tratamiento, según la pauta habitual, y cada 2-3 meses una vez finalizado el tratamiento activo.

En pacientes con estadio III localmente avanzado irresecable (N=14), el esquema de tratamiento utilizado fue una combinación de quimioterapia: carboplatino AUC5 (área bajo la curva) por vía intravenosa y vinorelbina 60 mg/m² días 1 y 8 vía oral, durante 4 ciclos, administrándose los dos últimos de forma concomitante con tratamiento de radioterapia a dosis de 54 a 66 Gy (Gray). Posteriormente como tratamiento de consolidación en aquellos en los que se había obtenido respuesta o estabilización de la enfermedad (N=14) se administró durvalumab por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal, cada 2 semanas, durante un máximo de 12 meses (36).

Los pacientes con CPCNP avanzado no tratado previamente, con expresión de PD-L1 en al menos el 50% de las células tumorales y sin mutación sensibilizante del EGFR o translocación de ALK, (N=18) recibieron pembrolizumab en una dosis fija de 200 mg por vía intravenosa cada 3 semanas como primera línea de tratamiento (37). También se empleó en 3 pacientes en tratamiento de segunda línea.

El tratamiento con nivolumab (N=2), administrado en una dosis de 3 mg/kg de peso cada 2 semanas por vía intravenosa, se utilizó en pacientes con CPCNP escamoso avanzado que hubieran presentado progresión de la enfermedad con quimioterapia de primera línea (112).

El tratamiento con atezolizumab (N=18) se administró a una dosis de 1.200 mg por vía intravenosa cada 3 semanas, en pacientes que habían recibido uno o dos regímenes de quimioterapia citotóxica previos (una o más terapias combinadas basadas en platino) para el CPCNP avanzado (113).

Tabla 3. Tipo de ICI administrado.

	n	%
Anti PD-1 Nivolumab	2	3,6
Anti PD-1 Pembrolizumab	21	38,2
Anti PD-L1 Atezolizumab	18	32,7
Anti PD-L1 Durvalumab	14	25,5
Total	55	100,0

La respuesta tumoral se estableció de acuerdo con los criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (v.1.1) (114). Se objetivó respuesta de la enfermedad en 35 pacientes, Tabla 4, (10 respuesta completa, 13 respuesta parcial, 12 enfermedad estable). 15 progresaron en el primer control, y 5 no pudieron llegar a ser evaluados radiológicamente.

Tabla 4. Mejor respuesta al tratamiento con ICI.

	n	%
RC	10	18,2
RP	13	23,6
EE	12	21,8
PR	15	27,3
No Evaluable	5	9,1
Total	55	100,0

3.4.3 PD-L1

La determinación de PD-L1 se llevó a cabo mediante tinción inmunohistoquímica (IHQ), por parte del servicio de Anatomía Patológica, clasificando a los pacientes en diferentes subgrupos: sin expresión o negativo (<1%), baja expresión (1–49%) o alta expresión (\geq 50%).

En las guías actuales para la determinación del biomarcador PD-L1 recomiendan las condiciones preanalíticas habituales de las pruebas IHQ. La expresión de PD-L1 se evalúa determinando el porcentaje de células tumorales con tinción parcial o total de la membrana de cualquier intensidad.

3.4.4 Toxicidad inmunorrelacionada

Se objetivó el desarrollo de toxicidad inmunorrelacionada en 25 de los pacientes (en algunos casos, a nivel de varios sistemas). Tabla 5.

Tabla 5. Toxicidad inmunorrelacionada y grado de severidad.

Toxicidad	N (Sí)	1	2	3	4	% global
Reacción infusional	1	1				2,7%
Endocrina	5	2	3			13,9%
Neumonitis	6	1	4	1		16,7%
Colitis	2		2			5,5%
Hepática	3	1	1		1	8,3%
Renal	4	1	1	2		11,1%
Neurológica	1			1		2,7%
Musculo Esquelética	5	2	1	2		13,9%
Cutáneas	6	3	2	1		16,7%
Cardiovascular	1			1		2,7%
Ocular	1	1				2,7%
Otras	1		1			2,7%
Total	36	12	15	8	1	100%

3.4.5 Muestras de heces

Cada paciente proporcionó muestras basales de heces previo a iniciar el tratamiento con ICI. Las muestras fueron recogidas y gestionadas por el Biobanco del Sistema Aragonés de Salud (integrado en la Red Nacional de Biobancos (PT20/00112)), al que se solicitaron las alícuotas necesarias para la realización del presente proyecto. Se procesaron según procedimientos operativos estándar con la correspondiente aprobación del Consejo de Ética y Comités Científicos.

3.4.5.1 Caracterización de la microbiota intestinal

Las muestras de heces se descongelaron a -20 °C durante 24 horas (h) y luego a 4 °C durante otras 24 h. Las muestras se suspendieron en 500 µL de agua MiliQ y la extracción de ADN se realizó con el kit de extracción QIAamp (Quiagen, Hilden, Alemania).

Se suspendieron 0,3-0,5g en 1 mL de agua MiliQ. Se centrifugó a 1.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 min y se realizó una transferencia de 200 µL de sobrenadante a tubos eppendorf. Se añadieron 100 µL de BT1 y 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml). Posteriormente se realizó un baño a 56°C durante 45 minutos (min) para la disolución completa. Se añadieron 200 µL de tampón, se homogeneizó y se llevó a un baño de 70°C durante 10 min. Adición de 200 µL de etanol 100%, se vorteoó y centrifugó 3 min a 8.000 rpm. El volumen se transfirió a una columna de extracción y se centrifugó 1 min a 8.000 rpm. Se desechó el tubo de recogida, se añadió el reactivo de lavado y nuevamente se centrifugó 1 min a 8.000 rpm. Se desechó nuevamente el tubo de recogida y se llevó la columna de extracción con filtro. Se añadió reactivo de lavado de nuevo y se centrifugó 3 min a 13.000 rpm. Se desechó el tubo de recogida y se llevó la columna de extracción a tubos eppendorf. Se añadieron 50 µL de agua MiliQ y se centrifugó 1 min a 13.000 rpm y, posteriormente, se añadieron 30 µL para acabar de eluir el volumen y desechar el filtro. El ADN bacteriano se conservó en tubos eppendorf a 4°C hasta el momento de su utilización. Se determinó la concentración y la calidad de la extracción de ADN mediante Qubit.

La secuenciación masiva de amplicones de las regiones variables V3 y V4 del 16S ADN_r se llevó a cabo utilizando la tecnología de extremo emparejado Mi-Seq 2 × 300 pb (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.), en la Unidad Central de Soporte de Genómica Traslacional en el Instituto de Investigaciones Sanitarias Ramón y Cajal.

Los cebadores empleados para la amplificación fueron:

- Cebador directo F341:

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG+CCTACGGGNGGCWGCAG

- Cebador inverso R805:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA+GGACTACHVGGGTATCTAATCC

Se eliminaron las secuencias de baja calidad o pequeño tamaño y se localizaron y contaron las variantes de secuencia de amplicones (ASV) representativas. Cada ASV fue

asignado taxonómicamente a un grupo taxonómico cuya correlación máxima era el nivel de género (a menudo, varios ASV fueron asignados al mismo grupo o permanecieron sin asignar y tuvieron que ser eliminados). Se empleó un clasificador de secuencia SILVA 138 para la asignación taxonómica. Finalmente, se generaron tablas de recuento de ASV/taxones por muestra biológica y árboles filogenéticos.

Posteriormente, se realizó el cálculo de índices de diversidad:

- Alfa diversidad: (cuántas especies y en qué proporción) es la diversidad intrínseca a la muestra. No tiene en cuenta las especies en sí, sino el porcentaje de cada diferente especie (proporciona el número de especies diferentes y el % de abundancia relativa).

- Parámetro Shannon: parámetro de alfa diversidad que tiene en cuenta el número de ASVs presentes en la muestra y la abundancia relativa de las mismas.
- Parámetro Faith-pd: parámetro de similitud (igualdad) teniendo en cuenta la distancia filogenética entre los diferentes ASVs. Es una medida de la alfa diversidad que tiene en cuenta la relación filogenética. Estudia la mínima distancia de ramas del árbol que contiene el 100% de las ASVs. A menos valor, menos diversidad.

- Beta-diversidad: compara diferentes muestras basándose en el número de especies y la abundancia relativa de las mismas.

- Unifrac weighted: tiene en cuenta la abundancia relativa de las diferentes especies en cada una de las muestras, incluyendo si los clados son los mismos o no en las diferentes muestras. Da más peso a los clados más abundantes. Al ser beta diversidad, compara las muestras entre sí.
- Unifrac unweighted: no tiene en cuenta la abundancia relativa de las especies, sino la presencia o ausencia de estas. Va a dar más peso a los clados poco frecuentes, porque en aquellas muestras/grupos en las que los haya, el valor de la diversidad aumenta.

- Abundancia diferencial de especies: Los parámetros estadísticos no tienen en cuenta la asignación taxonómica, solo a nivel de ASVs. Para calcular la abundancia diferencial se requiere el uso de herramientas como LefSe, que si tienen en cuenta el nombre de las bacterias.

- LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size): determina las características (organismos, clados, unidades taxonómicas operativas, genes o funciones) que tienen más probabilidades de explicar las diferencias entre clases, al combinar pruebas estándar de significancia estadística con pruebas adicionales que codifican la consistencia biológica y la relevancia del efecto.

Se acoplaron también pruebas estándar de significación estadística para evaluar la consistencia biológica y la relevancia del efecto observado (115).

El análisis bioinformático del procesamiento de las muestras y la asignación taxonómica derivada de la secuenciación de amplicones del 16S ADNr se realizó mediante el software QIIME2, versión 2021.11.

3.4.5.2 AGCC

Se procesaron las alícuotas de heces como se describió anteriormente (116). Se extrajeron al menos 30 mg de heces con 293,75 μ L de etanol y se agregó 6,25 μ L de ácido butírico deuterado D7 4 g/L como mezcla IS (CF 25 μ g/muestra). Después de agitar vigorosamente, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo con 5 μ L de hidróxido de sodio 0,8 M recién preparado. Los disolventes se evaporaron utilizando una centrífuga de vacío durante 3 h (Thermo Fisher SpeedVac™SPD121P, Dreieich, Alemania). Las sales residuales se redisolviaron en 50 μ L de alcohol etílico y se acidificaron con 10 μ L de ácido succínico 0,6 M inmediatamente previo a la realización del análisis.

El análisis por cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS) se realizó utilizando un cromatógrafo de gases TRACE 1600/1610/detector selectivo de masas ISQ7610 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania), equipado con una columna para GC TG-WaxMS A (15 m x 0,32 mm. x 0,25 μ m, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania). La temperatura del inyector, la línea de transferencia de GC-MS y la fuente de iones se configuraron en 200 °C, 215 °C y 250 °C, respectivamente.

El caudal del gas portador helio comenzó inicialmente a 2,5 ml/min, se mantuvo durante 2 min y luego se aumentó a una velocidad de 1 ml/min a 5 ml/min, donde se mantuvo durante 1 min. Posteriormente se introdujo 1 μ L de la muestra mediante inyección splitless. La temperatura inicial de la columna se fijó en 55 °C y se mantuvo durante 1 min, luego se elevó a 105 °C a una velocidad de 8 °C/min, donde se mantuvo durante 2 min. Por último, la temperatura de la columna se elevó a 190 °C a una velocidad de 30 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 1 min. Se añadió un paso extra para eliminar posibles restos: se elevó la temperatura a 210 °C a una velocidad de 20 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 3 min.

La ionización se realizó en modo de impacto electrónico a 70 eV. Inicialmente, los datos de MS se adquirieron en modo de exploración completa con una relación masa-carga (m/z) de 40 a 130 y con un tiempo de exploración de 0,2 s. Los AGCC se detectaron entre el min 4,7 y el 12,5.

Los compuestos se identificaron comparando los espectros de MS obtenidos con la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología y se confirmaron comparándolos con los tiempos de retención de los estándares puros. Se operó el instrumento y los datos se adquirieron y analizaron utilizando el software Chromeleon 7.

3.4.6 Muestras de sangre

Cada paciente también proporcionó muestras basales de sangre al Biobanco del Sistema Aragonés de Salud previo al inicio del tratamiento con ICI.

La sangre se recogió en tubos de heparina sódica y se centrifugó durante 10 min a temperatura ambiente a 2.600 rpm. De este modo se separó la fracción celular del plasma, que se extrajo con un sedimento celular y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

3.4.6.1 Citrulina

La cuantificación de citrulina se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en el Instituto de Carboquímica de Zaragoza (ICB-CSIC). Figura 12.

Preparación de la recta de calibrado: se prepararon diferentes concentraciones de L-Citrulina, L-Asparagina y L-Arginina (estas dos últimas por la relación con el metabolismo de la citrulina).

Se preparó una concentración 2,5 mM utilizando 50 ml de agua desionizada y 21,9 mg de L-Citrulina, 16,5 mg de L-Asparagina y 21,75 mg de L-Arginina. Posteriormente se realizó la dilución de la concentración a 0,25 mM. A partir de este vial, se prepararon varias diluciones utilizando agua desionizada y cloruro de hidrógeno (para facilitar la lectura de los resultados), obteniendo distintas concentraciones entre $0,5\ \mu\text{M}$ y $100\ \mu\text{M}$. Después, la derivatización de todos los viales, añadiendo una preparación reconstituida de Accq-flúor para el análisis ulterior de las muestras mediante detección por fluorescencia.

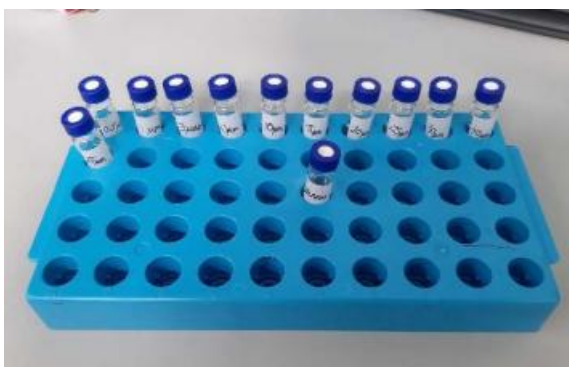


Figura 12. Viales con concentraciones entre $0,5\ \mu\text{M}$ y $100\ \mu\text{M}$ de los patrones utilizados para el cálculo de la recta de calibrado (izquierda). Vista general de un HPLC (derecha).

Preparación del HPLC para el procesamiento de las muestras: Se equilibró y acondicionó la columna utilizando la fase móvil y el gradiente a usar durante el análisis. Se determinó el volumen de inyección que el HPLC tomaría de cada uno de los viales preparados con anterioridad. Se pautó el tiempo de gradiente (tiempo que tarda en pasar la muestra a analizar por la columna del HPLC) y el método de gradiente (modo de paso de la muestra a analizar por la columna). Se estableció una temperatura de columna de 37°C , temperatura de carrusel de 10°C y un flujo de paso por la columna de $1\ \text{ml}/\text{min}$. Volumen de inyección de los viales de $5\ \mu\text{L}$ que, junto al agua desionizada, la fase móvil y el acetonitrilo, pasan por la columna de análisis (estas 3 últimas sustancias favorecen el paso

de la preparación a través de la columna). Establecida la secuencia de pinchazo e introducidas las preparaciones en el carrusel, los viales fueron analizados por el HPLC en un periodo aproximado de 60 min por cada vial introducido. Figura 13.

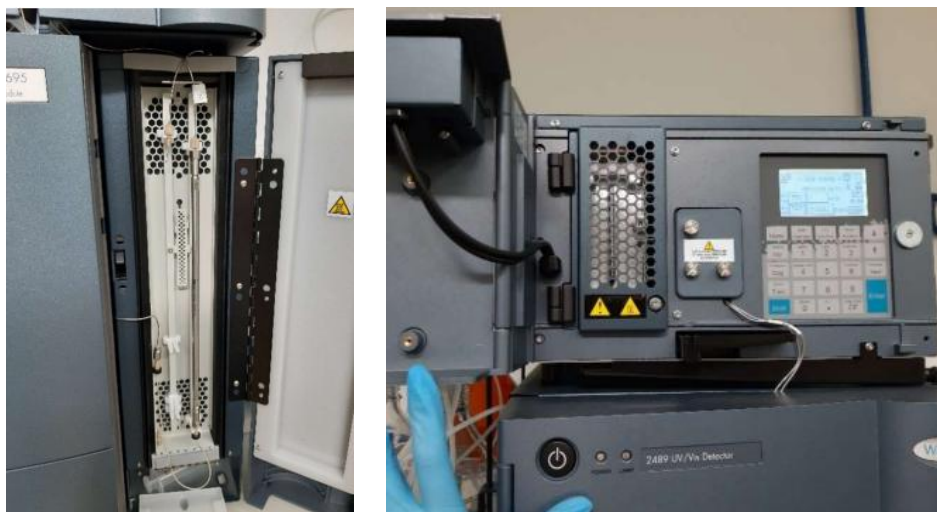


Figura 13. Vista general de una columna de análisis de un HPLC (izquierda) y del detector de fluorescencia asociado a esta (derecha).

Desde los carruseles o ruedas portaviales en los que se introducen las preparaciones, se toman distintas cantidades que, junto al agua desionizada, fase móvil y el acetonitrilo, pasan a lo largo de la columna de análisis. Las moléculas se quedan más o menos retenidas en la columna según sus propiedades químicas. Conforme se produce la salida de la columna de las distintas moléculas, el HPLC cuantifica cada compuesto mediante un detector de fluorescencia: a mayor cantidad de una sustancia, mayor nivel de fluorescencia y viceversa. Posteriormente estas mediciones se analizaron mediante un programa informático, permitiendo la consulta y lectura de los resultados.

La determinación de citrulina se realizó en el suero obtenido tras la centrifugación del plasma de los pacientes. Una vez descongelado el suero, se precipitan las proteínas contenidas en estos mediante la adición de 50 μL de HCl 0,6 molar a 50 μL de suero. Se introducen las muestras en la centrifugadora a 11.400 rpm durante 5 min para separar las proteínas precipitadas, del suero en el que quedan contenidas las fracciones libres de Citrulina, Arginina y Asparagina. Esta última parte es la que se analiza en el HPLC. Se toman 20 μl del sobrenadante, y se derivatiza con Accq-flúor en un vial vacío para permitir que la muestra se pueda detectar posteriormente mediante fluorescencia.

Se introducen los valores de tiempo de gradiente, método de gradiente y volúmenes de inyección a tomar de cada uno de los viales preparados con los sueros de los pacientes; estos valores son coincidentes con los citados con anterioridad.

Finalmente se introducen los viales en el carrusel y se establece la secuencia de pinchado. Tras el procesamiento de las muestras por el HPLC se volcarán los resultados y se interpolan los valores de citrulina, arginina y asparagina en la recta de calibrado, obteniendo así las concentraciones de dichos analitos en el suero de los pacientes.

Una vez completado el análisis de las muestras, los resultados se representan informáticamente de dos maneras:

- Cromatograma: las distintas sustancias detectadas por el HPLC se corresponden a un pico de la gráfica. La altura será mayor o menor dependiendo de la cantidad de sustancia que haya en la muestra. Figura 14.

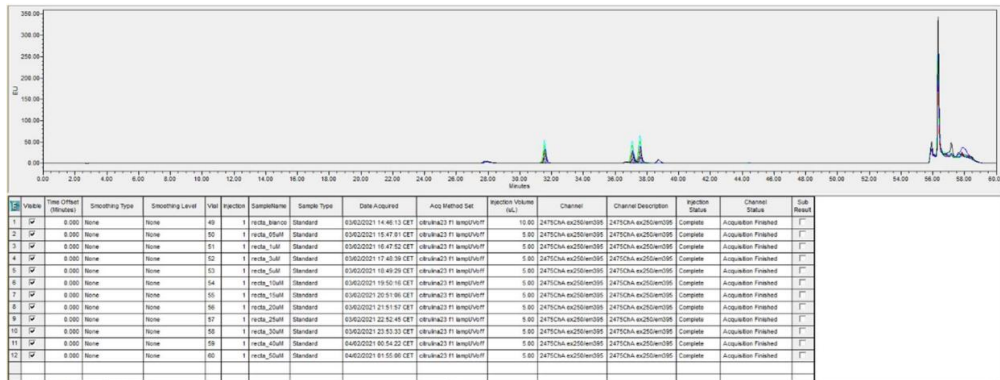


Figura 14. Ejemplo de gráfica de representación de resultados obtenidos mediante HPLC.

- Rectas de calibrado: permiten interpolar el área de cada pico correspondiente a cada analito, cuantificando cada una de las sustancias presentes en las muestras. Figura 15.

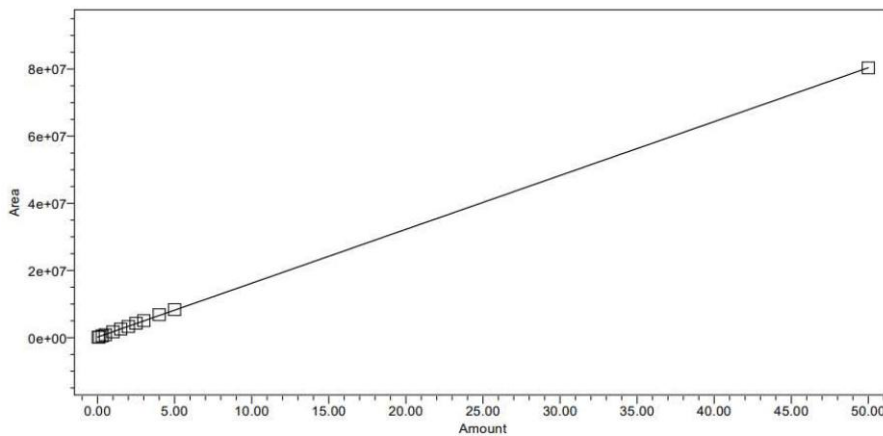


Figura 15. Ejemplo de recta estándar de Citrulina calculada con los procedimientos anteriormente mencionados.

Una vez obtenidos estos resultados, se genera una gráfica con los picos de sustancias correspondientes a las muestras de los pacientes. Figura 16,

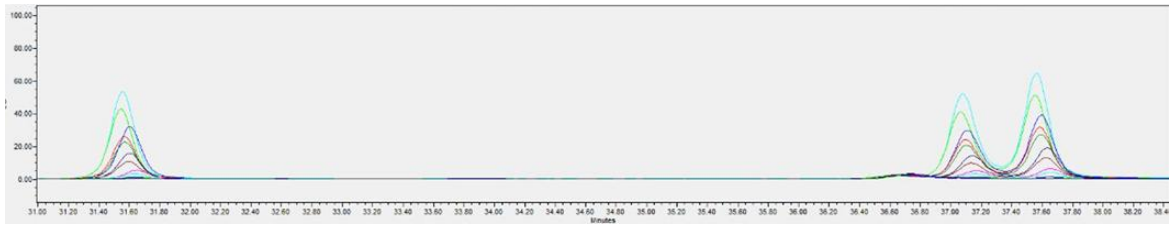


Figura 16. Resultado gráfico del análisis de una muestra de suero en HPLC, para la evaluación de los niveles de Asparagina, Arginina y Citrulina.

3.4.6.2 Anticuerpos anticitrulina

Los anticuerpos anticitrulina (también conocidos como anti-péptido cíclico citrulinado o CCP3G) se analizaron mediante técnicas de inmunoensayo por quimioluminiscencia estandarizadas, utilizando el sistema óptico BIO-FLASH (Biokit, Barcelona, España) en el laboratorio de Inmunología del HCULB, Zaragoza.

Los agentes reactivos necesarios para la tecnología de inmunoensayo por quimioluminiscencia son:

- Micropartículas paramagnéticas recubiertas de una molécula de captura (antígeno, anticuerpo o virus) específica para el analito que se desea medir. En este caso, el analito es el CCP3G. Reactivo QUANTA Flash CCP3 IgG.
- Conjugado marcado con un derivado del isoluminol, “ABEI activado” (ONS-HS-N-(4-aminobutil)-N-etil-isoluminol).
- Un oxidante y un catalizador, contenidos en las soluciones trigger 1 y 2.

Para el estudio del analito CCP3G, el límite de detección (valor más bajo de la magnitud en una muestra para el cual existe una razonable certeza (95%) de que el valor estimado de una medición será diferenciado del valor cero) fue 4,6. El límite de cuantificación máximo (valor a partir del cual se establece error sistemático por desviación de la recta de calibración) fue de 2776,8. Estableciendo por tanto un rango de trabajo (intervalo de valores de una magnitud en el que el procedimiento de medida se aplica sin modificaciones) de 4,6-2776,8. Tabla 6.

Tabla 6. Especificaciones técnicas del método.

Analito	LD	LQM	RT
CCP3G	4.6	2776.8	4.6 – 2776.8

LD, Límite de detección: valor más bajo de la magnitud en una muestra para el cual existe una razonable certeza (95%) de que el valor estimado de una medición será diferenciado del valor cero. LQM, Límite de cuantificación máximo: también llamado límite de dilución, valor a partir del cual se establece error sistemático por desviación de la recta de calibración.

RT, Rango de trabajo: intervalo de valores de una magnitud en el que el procedimiento de medida se aplica sin modificaciones.

Secuencia de reacción: Las micropartículas paramagnéticas recubiertas con la molécula de captura se mezclan con la muestra. Durante la incubación, el analito presente en la

muestra se une a las moléculas de captura que recubren la micropartícula formando el complejo inmune. Después de la incubación, un imán atrae a las micropartículas paramagnéticas (unidas a un analito específico) hacia la pared interna de la cubeta de reacción. Posteriormente la mezcla de reacción sufre un proceso de lavado para eliminar los materiales no unidos. El conjugado quimioluminiscente marcado con “ABEI activado” se une al inmunocomplejo completando la mezcla de la reacción. Después de la incubación, dicha mezcla sufre un proceso de lavado para eliminar el conjugado no unido. El conjugado de “ABEI activado” desencadena la reacción quimioluminiscente cuando se añaden a la cubeta los reactivos “iniciadores” contenidos en las soluciones trigger 1 y 2 [un oxidante (peróxido de urea) y un catalizador (una molécula de porfirina con un átomo de hierro en medio alcalino)]. La reacción quimioluminiscente es instantánea, emitiéndose un destello de luz que dura menos de 10 segundos (s). La luz generada por la reacción se mide como unidades relativas de luz mediante el sistema óptico del BIO-FLASH. Figura 17. Esta medición se convierte en un valor de concentración para los ensayos cuantitativos y en un resultado cualitativo para los ensayos de punto de corte.

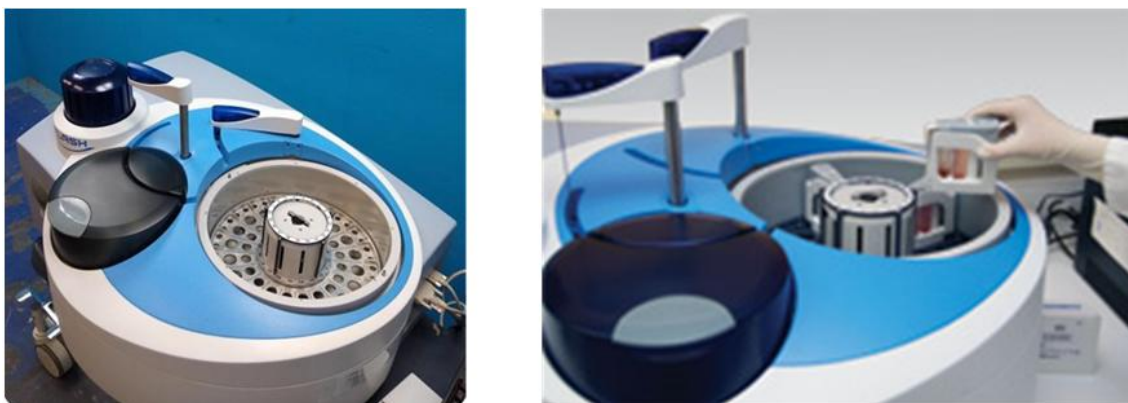


Figura 17. Carrusel de reactivos del instrumento BIO-FLASH.

3.4.6.3 Zonulina

Para la determinación cuantitativa de zonulina humana en plasma, se utilizó el Human Zonulin ELISA kit, (Cusabio, número de catálogo CSB-EQ027649HU).

Este kit emplea la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich. Se recubre previamente una microplaca con anticuerpo específico para zonulina. Los estándares y las muestras se pipeteen en los pocillos y la zonulina presente se une al anticuerpo inmovilizado. Tras eliminar las sustancias no unidas, se añade a los pocillos un anticuerpo conjugado con biotina específico para la zonulina. Después del lavado, se añade a los pocillos peroxidasa de rábano picante conjugada con avidina. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo de enzima avidina no unido, se agrega una solución de sustrato a los pocillos y el color se desarrolla en proporción a la cantidad de zonulina unida en el paso inicial. Se detiene el desarrollo del color y se mide la intensidad del color.

Rango de detección: 0,625 ng/mL-40 ng/mL. La cifra mínima detectable de zonulina humana suele ser inferior a 0,156 ng/mL.

Este análisis tiene una alta sensibilidad y excelente especificidad para la detección de zonulina humana. No se observó reactividad cruzada significativa ni interferencia entre la zonulina humana y sus análogos.

Se descongelaron las muestras, previamente almacenadas entre 2-8°C durante un máximo de 5 días. Se utilizó un tubo separador de suero y se deja que las muestras coagulen durante dos h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifuga durante 15 min a 2.800 rpm. Se retira el suero y se analiza inmediatamente.

Procedimiento para el análisis: Se agregan 100 µL de estándar y muestra por pocillo y se incuba durante 2 h a 37°C. Retirada del líquido de cada pocillo, sin lavar. Se agregan 100 µl de anticuerpo biotina (1x) a cada pocillo y se incuba durante 1 h a 37°C. Se aspira cada pocillo y lava, repitiendo el proceso dos veces para un total de tres lavados. Se agregan 100 µl de HRP-avidina (1x) a cada pocillo y se incuba durante 1 h a 37°C. Se repite el proceso de aspiración/lavado 5 veces. Se agregan 90 µl de sustrato TMB a cada pocillo y se incuba durante 15-30 min a 37°C. Protegiendo en todo momento de la luz. Se agregan 50 µl de solución de parada a cada pocillo. Por último, se determina la densidad óptica de cada pocillo en 5 min, utilizando el lector de microplacas configurado a 450 nm.

Para el cálculo de resultados se utilizó el software profesional "Curve Expert" mediante la realización una curva estándar mediante un ajuste polinomial.

3.4.6.4 Endotoxina

Para la determinación cuantitativa de las concentraciones de endotoxina en plasma se utilizó el kit de ensayo de endotoxinas LAL cromogénica ToxinSensor™ (GenScript USA Inc., Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.). Figura 18.

Preparación de reactivos:

- Lyophilized Ambocyte Lysate (LAL): 1.7mL LAL reagent water. Se mezcla con sustrato cromogénico girando 30 s.
- Estabilizador de color #1: Se añaden 2mL de ácido clorhídrico concentrado a 50mL de LAL reagent water, para obtener una concentración final de 0,46 M HCl.
- Estabilizador de color #2, #3: añadiendo 10 mL LAL reagent water en cada uno.
- Solución estándar endotoxinas: 2 mL LAL reagent water. Girar durante 15 min. Diluciones seriadas a 1,0, 0,5, 0,25 y 0,1 EU/mL.

Procedimiento: Se emplean 100 µl de estabilizador, muestra y LAL reagent water (control blanco). Se gira la muestra 30 s. Se añaden 100 µl de LAL reconstituido a cada vial y un blanco con LAL reconstituido a un vial vacío. Se tapan y mezclan girando suavemente. Incubación a 37°C en aire saturado de humedad y 5% dióxido de carbono durante 35 min. Se añaden 100 µL de sustrato cromogénico reconstituido y se mezcla girando sin agitar ni invertir. Incubación a 37°C durante 6 min. Se añaden 500 µL de solución de stop reconstituida, 500 µL de estabilizador de color #2 y #3, y se mezcla girando 3 s. Se pasan 200 µL de cada vial a placa de 96 pocillos. Se empleó agua destilada como control de absorbancia 0. Lectura de absorbancia a 545nm. Imagen 7.

La absorbancia en condiciones estándar muestra una relación lineal con la concentración.

	Standards	Samples	Blank
Standards (mL)	0.1	-	-
Samples (mL)	-	0.1	-
LAL Reagent Water (mL)	-	-	0.1
LAL (mL)	0.1	0.1	0.1
Mix well and incubate at 37 ± 1.0°C	T1 or T2	T1 or T2	T1 or T2
Substrate solution (mL)	0.1	0.1	0.1
Mix well and incubate at 37 ± 1.0°C (min)	6	6	6
Stop Solution (mL)	0.5	0.5	0.5
Color-stabilizer #2 (mL)	0.5	0.5	0.5
Color-stabilizer #3 (mL)	0.5	0.5	0.5

Mix well and read the absorbance at 545 nm

Figura 18. Tabla resumen del procedimiento de detección cuantitativa de Endotoxina.

3.5 Análisis estadístico

Los análisis descriptivos (variables clínico-patológicas y tratamiento) y de supervivencia (curvas de Kaplan-Meier, modelos de regresión de Cox y correlación de Pearson o Spearman) se realizaron mediante el software Prism 10 y Orange 3, considerándose estadísticamente significativo un valor de probabilidad (p) < 0,05.

Para el cálculo de la muestra se definió un tamaño muestral de 50 pacientes más un 10% (5 pacientes) por las posibles pérdidas con un total 55 pacientes, reclutados de forma prospectiva desde la consulta de cáncer de pulmón del Servicio de Oncología Médica del HCULB, durante la práctica clínica asistencial, candidatos a recibir tratamiento con ICI. Periodo de reclutamiento entre abril 2019 y octubre 2020.

El cálculo muestral considerado obedece a criterios exploratorios de búsqueda de señales iniciales de evidencia científica ante la escasez de información disponible.

3.6 Comité Ético

Este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) con código (C.I. PI19/052). Todos los pacientes incluidos dieron su consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio.

4. Resultados

4.1 Características basales

Todos los pacientes (N=55) eran de raza caucásica, 39 (71%) eran varones, y 16 (29%) mujeres. Tabla 7.

Solo 8 (15%) eran menores de 75 años, frente a los 47 restantes (85,4%), de 75 años o más.

El ECOG fue 0 en 36 pacientes (65,5%) y 1 en 19 (34,5%).

En cuanto a la histología tumoral, 22 pacientes fueron catalogados como carcinoma escamoso (40%) y los otros 33, como adenocarcinoma (60%).

Con respecto al estadio, se incluyeron 14 pacientes estadio III irresecable (25,5%), y 41 estadio IV (74,5%): primera línea de tratamiento en 18 pacientes (32,7%) y segunda línea o superior en 23 pacientes (41,8%).

Se administró durvalumab en 14 pacientes (25,5%), pembrolizumab en 21 (38,2%), atezolizumab en 18 (32,7%) y nivolumab en 2 (2%).

Tabla 7. Características basales de los pacientes.

Características	N = 55	%
Sexo		
Hombre	39	71%
Mujer	16	29%
Edad		
<75	47	85%
≥75	8	15%
ECOG		
0	36	65,5%
1	19	34,5%
Histología		
Escamoso	22	40%
Adenocarcinoma	33	60%
Estadio tumoral		
Estadio III irresecable	14	25,5%
Estadio IV	39	74,5%
Indicación de tratamiento		
Localmente avanzado	14	25,5%
Primera línea	18	32,7%
Segunda línea o superior	23	41,8%
Fármaco ICI		
Durvalumab	14	25,5%
Pembrolizumab	21	38,2%
Atezolizumab	18	32,7%
Nivolumab	2	2%

En lo referente a la respuesta al tratamiento con ICI, Tabla 8, de los 55 pacientes reclutados, 35 presentaron respuesta al tratamiento con ICI:

- 13 (37,1%) eran carcinomas escamosos (de los cuales 9 fueron varones) y 22 (62,9%) adenocarcinoma (15 varones).
- El ECOG PS fue cero en 28 de ellos (80%) y uno en los otros 7 (20%).

Por otro lado, en los 20 pacientes que no respondieron a la ICI:

- Nueve (45%) eran escamosos (8 varones) y 11 (55%) adenocarcinoma (7 varones).
- El ECOG PS fue cero en 9 de ellos (45%) y uno en los otros 11 (55%).

La edad media tanto en aquellos que respondieron al tratamiento como los que progresaron, fue de 65 años.

Con respecto a los valores de la lactato deshidrogenasa (LDH) plasmática, todos los pacientes que alcanzaron una respuesta completa al tratamiento con ICI presentaron valores normales basales. Los valores de LDH basal en los 20 pacientes que no respondieron a la ICI fueron superiores al límite de la normalidad.

Tabla 8. Características según la respuesta al tratamiento con ICI.

Respuesta al tratamiento	SI (N=35)	NO (N=20)
Histología		
Escamoso	13 (37%)	9 (45%)
Adenocarcinoma	22 (63%)	11 (55%)
Sexo		
Varón	24 (68,5%)	15 (75%)
Mujer	11 (31.5%)	5 (25%)
ECOG		
0	28 (80%)	9 (45%)
1	7 (20%)	11 (55%)

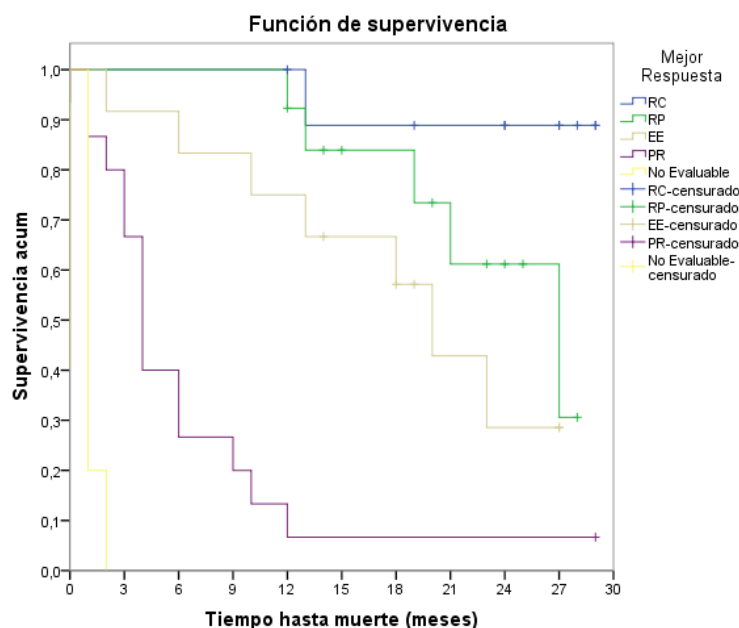
4.2 Toxicidad inmunorrelacionada y respuesta

Del total de los 55 pacientes, solo 35 (63,3%) respondieron al tratamiento con ICI. En cuanto a la toxicidad inmunorrelacionada, estuvo presente en 25 pacientes: 20 (80%) dentro del grupo de los respondedores a ICI, y 5 (20%) de los que no hicieron respuesta al tratamiento. Tabla 9.

Las toxicidades más frecuentes fueron la cutánea y la neumonitis (16,7% en ambas), seguidas de la toxicidad endocrina y músculo-esquelética (13,9%). Tabla 5.

La SG, Figura 19, fue estadísticamente significativa superior, para $p < 0.05$, en el grupo de pacientes que respondió a ICI, con una mediana de 27 meses (IC 18,15-35,85) para aquellos pacientes que consiguieron una respuesta parcial como mejor respuesta, 20 meses (IC 15,46-24,54) para los que obtuvieron una estabilización de la enfermedad, frente a 4 meses (IC 3,07-4,93) en aquellos que tras una primera evaluación presentaron progresión de la enfermedad.

Con respecto a la SLP, también se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$ en los pacientes respondedores a ICI (IC 2,81-17,19), con una mediana de



14 meses para aquellos pacientes que consiguieron una respuesta parcial como mejor respuesta, 10 meses para los que obtuvieron una estabilización de la enfermedad, frente a 2 meses en aquellos que tras una primera evaluación ya presentaban progresión de la enfermedad.

Figura 19. Análisis de supervivencia global mediante Kaplan-Meier, según la respuesta al tratamiento con ICI.

En cuanto al desarrollo de irAEs, de los 35 pacientes (63,3%) que respondieron al tratamiento con ICI, 20 desarrollaron toxicidad (57%), frente a solamente de 5 pacientes del grupo de los no respondedores (25%). Tabla 9.

Tabla 9. Características según la presencia de irAEs.

Desarrollo irAEs	SI (N=25)	NO (N=30)
Respuesta al tratamiento		
Sí	20 (57%)	15 (43%)
No	5 (25%)	15 (75%)
Histología		
Escamoso	12 (48%)	10 (33%)
Adenocarcinoma	13 (52%)	20 (66%)
ECOG		
0	19 (76%)	17 (57%)
1	6 (24%)	13 (43%)

Dentro del grupo que desarrolló irAEs (N = 25), 12 (48%) fueron carcinomas escamosos y 13 adenocarcinoma (52%). El ECOG PS fue 0 en 19 de ellos y 1 en los otros 6. La edad media fue de 68 años.

De los 30 pacientes que no desarrollaron irAEs, 10 se correspondieron con histología de escamosos (33%) y 20 adenocarcinomas (67%). El ECOG PS fue 0 en 17 de ellos y 1 en los 13 restantes. La edad media fue de 63,5 años.

Destaca que el ECOG PS 1 fue más frecuente (76% vs 57%), en aquellos pacientes que no lograron una respuesta al tratamiento con ICI.

El desarrollo de irAEs fue similar en ambos subgrupos a nivel de histología.

En lo referente al estudio de la SG según el desarrollo de irAEs, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para $p < 0.05$. A pesar de ello, el nivel de significación se encontró muy cerca del punto crítico, siendo $p = 0.051$ (IC 11,13- 26,87). La mediana de supervivencia para el grupo que no presentó toxicidad fue de 6 meses, frente a los 21 meses del grupo que sí desarrolló irAEs.

Sí se objetivan diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$ (IC 2,81-17,19) en el estudio de la SLP y el desarrollo de irAEs, Figura 20. La mediana de SLP para el grupo que no presentó toxicidad fue de 6 meses, frente a los 20 meses del grupo en el que sí se desarrollaron irAEs.

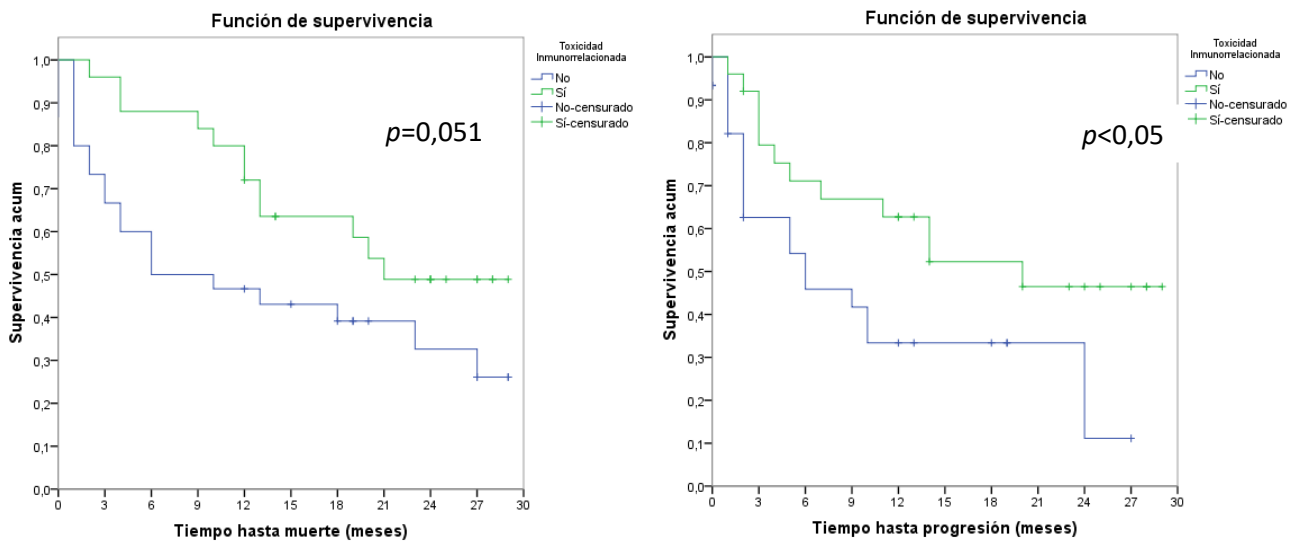


Figura 20. Análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier, según la aparición de efectos adversos inmunorrelacionados: (A) Supervivencia global. (B) Supervivencia libre de progresión, estadísticamente significativo para $p < 0,05$. Respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE), progresión de enfermedad (PR), no evaluado (NE).

En lo referente al estudio de PD-L1, Tabla 10: en el grupo de respondedores ($n = 35$), el PD-L1 fue $< 1\%$ en 10 pacientes (28,5%), 1–49% en 13 (37%) y $\geq 50\%$ en 11 pacientes (31,5%). En un paciente, el resultado no fue concluyente.

Por el contrario, en los pacientes que no respondieron a la terapia con ICI ($n = 20$), el PD-L1 fue $< 1\%$ en cinco (25%) pacientes, 1–49% en ocho pacientes (40%) y $\geq 50\%$ en cinco pacientes (25%); los resultados no fueron valorables en dos pacientes.

Tabla 10. Características según respuesta al tratamiento y niveles de PD-L1.

Respuesta al tratamiento	SI (N=35)	NO (N=20)
PD-L1		
<1%	10 (28,5%)	5 (25%)
1-49%	13 (37%)	8 (40%)
≥50%	11 (31,5%)	5 (25%)
No concluyente	1 (3%)	2 (10%)

Cabe destacar que de los 10 pacientes que lograron una respuesta completa, en 5 de ellos, el valor de PD-L1 fue 1-49%, y en los otros 5, ≥50%. La determinación de PD-L1 no se correlaciona claramente con la respuesta a la terapia con ICI, por lo que se necesita con urgencia el descubrimiento/desarrollo de factores predictivos para el tratamiento de inmunoterapia en el CPCNP.

4.3 Composición de la microbiota intestinal

La composición de la microbiota intestinal, considerando las diversidades alfa y beta, fue comparable en todos los pacientes independientemente de su respuesta a ICI o la aparición de irAEs (Figura 21).

Sin embargo, el análisis LEfSe mostró diferencias estadísticamente significativas para el filo Bacillota, incluyendo una mayor abundancia de *Clostridia* y *Monoglobus* en los respondedores a ICI, y de *Hungatella* en los no respondedores.

Por otro lado, los pacientes que desarrollaron irAEs presentaban una abundancia significativamente mayor de Beta-proteobacteria y *Enterococcus*, haciéndolo en detrimento de *Negativicutes* y otros géneros del filo Bacillota.

Akkermansia estuvo escasamente representada entre nuestros pacientes, siendo indetectable en casi la mitad de ellos, y con escasas lecturas en el resto. Por este motivo, no se pudieron establecer correlaciones con su abundancia y la respuesta a la ICI o los irAEs.

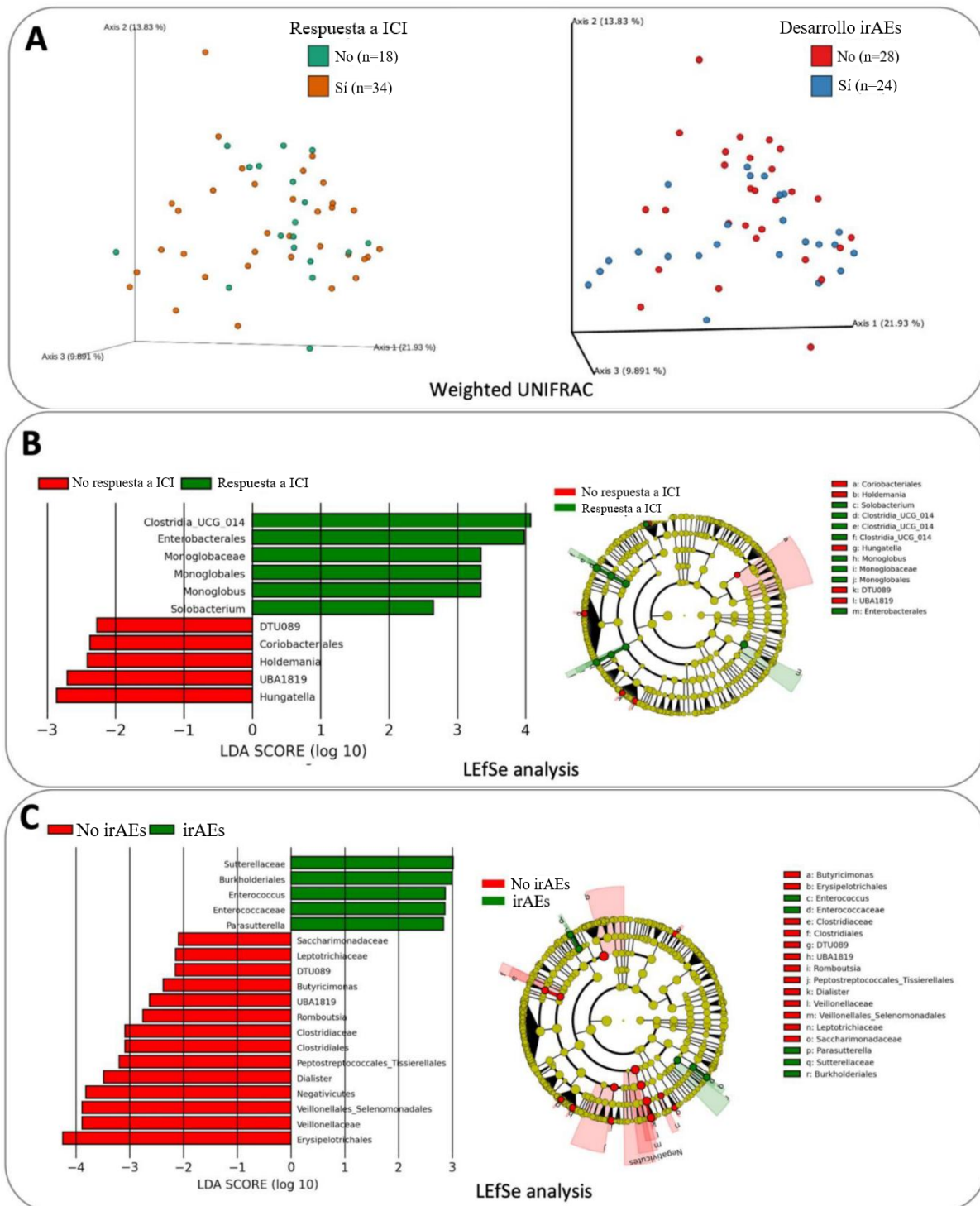


Figura 21. Composición bacteriana en los diferentes grupos utilizados en este estudio: (A) análisis UNIFRAC ponderado que no logró separar a los pacientes que respondieron y a los que no respondieron a los ICI, así como a los pacientes con y sin irAE; (B) Cladograma. Resultados de análisis LefSe para pacientes que respondieron y no respondieron al tratamiento con ICI; (C) resultados de análisis LefSe para pacientes según desarrollo o no, de toxicidad por ICI.

4.4 AGCC

Los AGCC con mayor presencia global en los pacientes fueron el ácido acético (56%), propiónico (19%) y butírico (11%), mientras que los ácidos valérico (5%), isovalérico (5%) e isobutírico (4%) se detectaron en proporciones más bajas.

Las distribuciones de cada uno de los AGCC y los análisis posteriores basados en la respuesta ICI y desarrollo de irAEs se muestran en la Figura 22.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos.

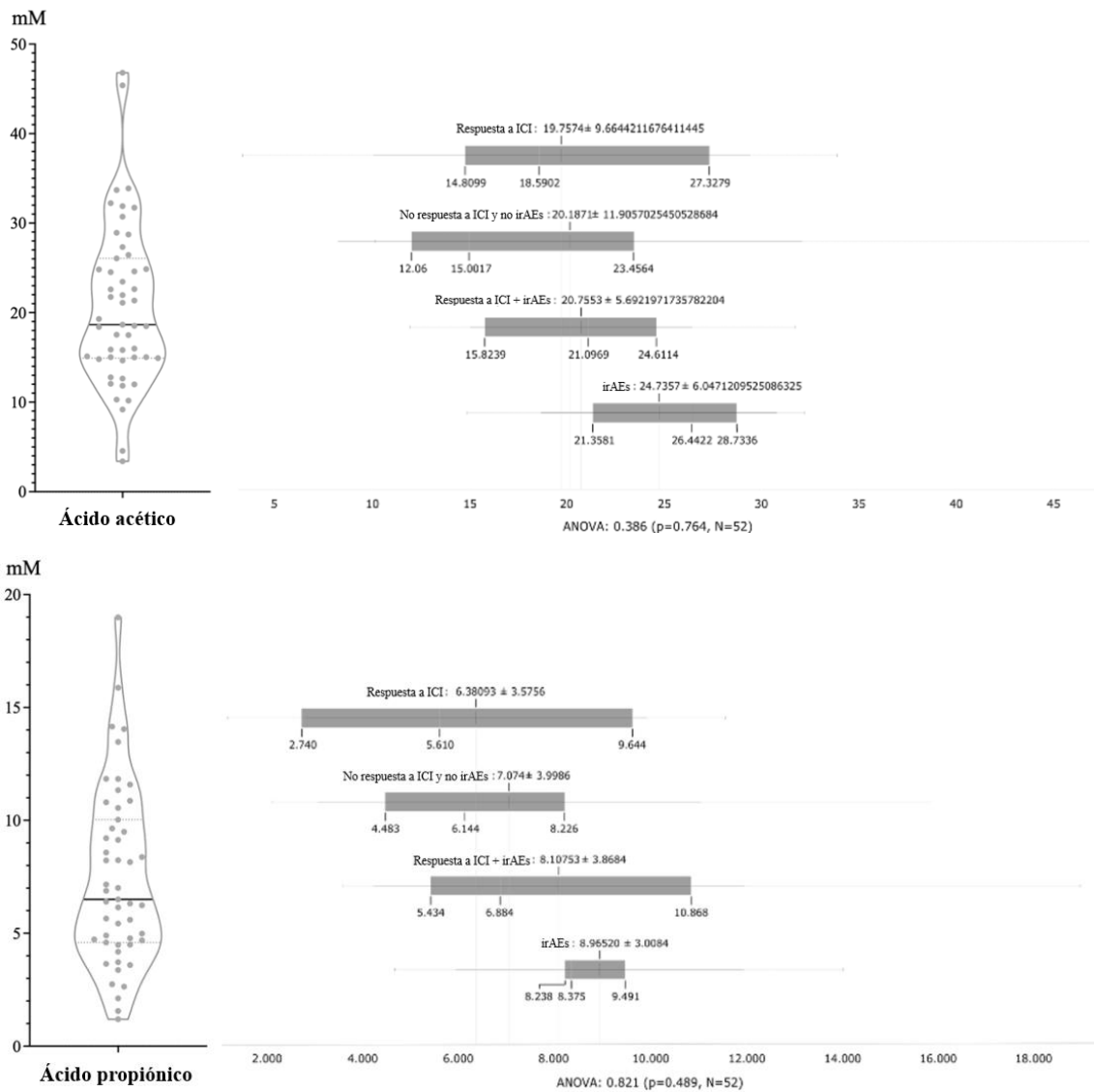


Figura 22. Continúa.

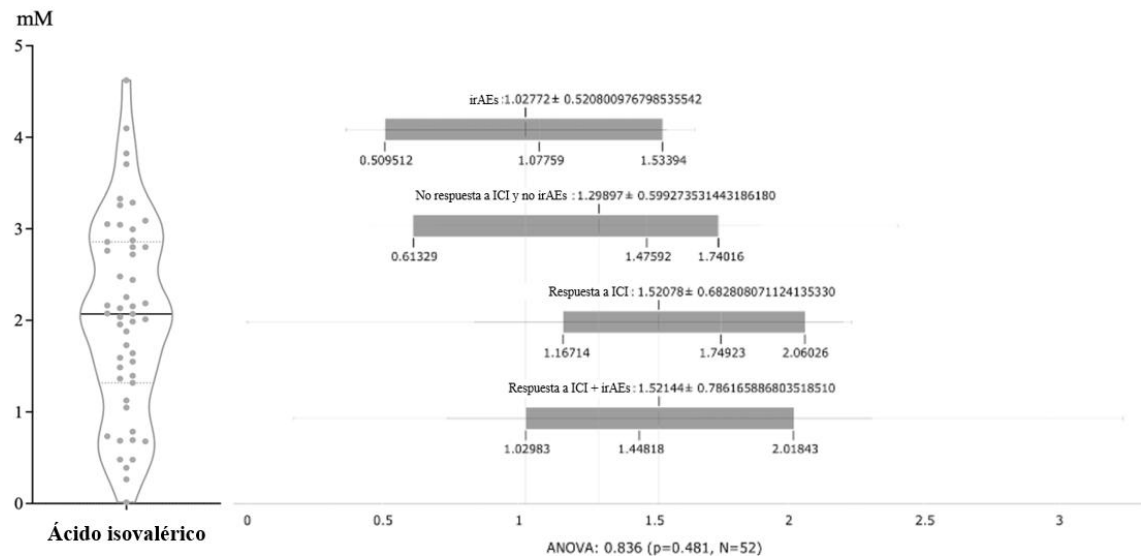
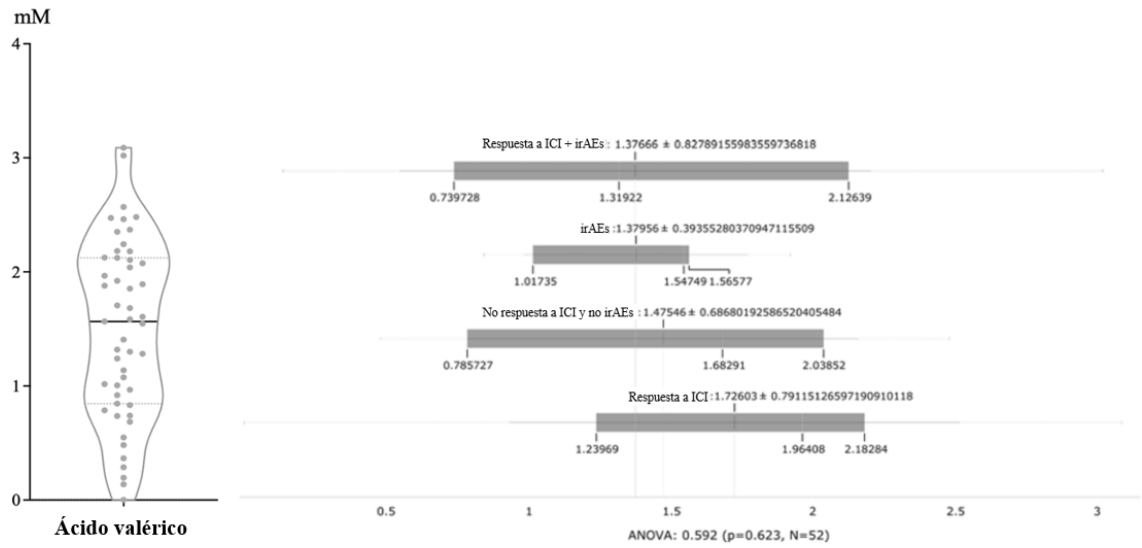
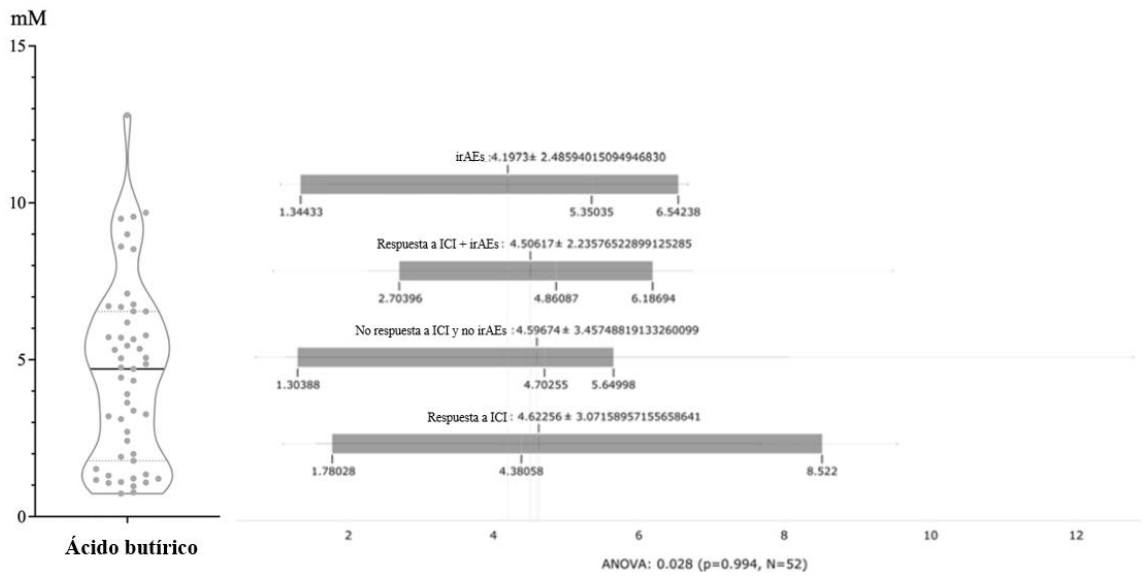


Figura 22. Continúa.

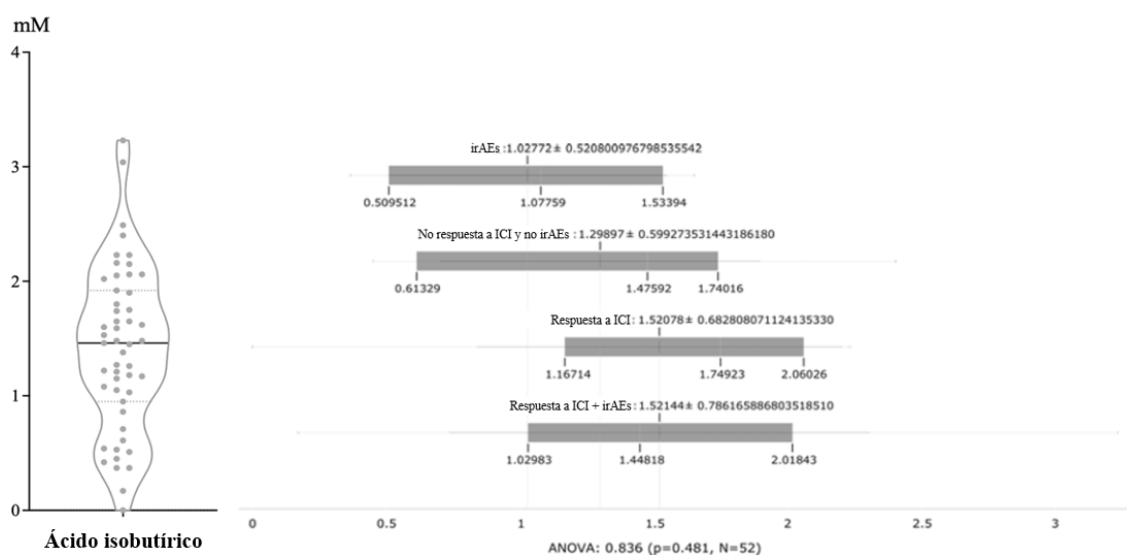


Figura 22. Valores obtenidos para cada uno de los AGCC y su análisis estadístico según grupo de pacientes: respuesta, respuesta y toxicidad, solo toxicidad y ninguna de ellas. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los 4 grupos preespecificados, ni para ningún AGCC.

4.5 Biomarcadores de permeabilidad de membrana en sangre periférica

4.5.1 Distribución serológica

La distribución serológica de la concentración de cada uno de los parámetros se muestra en la Figura 23.

La citrulina mostró la mayor dispersión. Pudo realizarse el análisis correcto en 53 pacientes, con un valor mínimo de 0,0 $\mu\text{mol/L}$ y una detección de valor máximo en 29,2 $\mu\text{mol/L}$; con una mediana de 7,6 $\mu\text{mol/L}$; media de 8,5 $\mu\text{mol/L}$; IC media 95% 6,6-10.

El estudio de los anticuerpos anticitrulina pudo realizarse en 52 de los pacientes, y mostró unos valores negativos (0-5,25 U/ml) en 49 de ellos (94%), frente a 3 pacientes (6%) con resultados positivos (>5,25 U/ml). Valor máximo 377,9 U/ml, con una mediana de 0,0 U/mL y una media de 9 U/ml.

El análisis de la zonulina pudo llevarse a cabo en 53 pacientes, con unos niveles mínimos de 0,1 ng/ml, y máximo de 29,1 ng/ml. Mediana de 1,7 ng/ml; media de 2,8 ng/ml; IC media 95% 1,6-4,0.

El estudio de los niveles de endotoxina se realizó en 53 pacientes, con detección de niveles entre 2,1 UE/ml y 29,9 UE/ml de máximo. Mediana de 5,3 UE/ml; media de 5,9 UE/ml; IC media 95% 4,8-7,0.

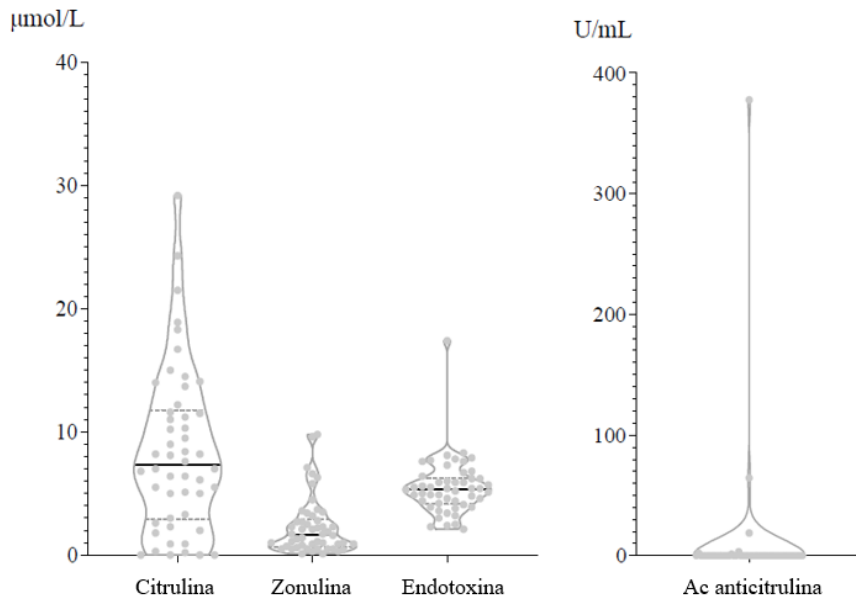
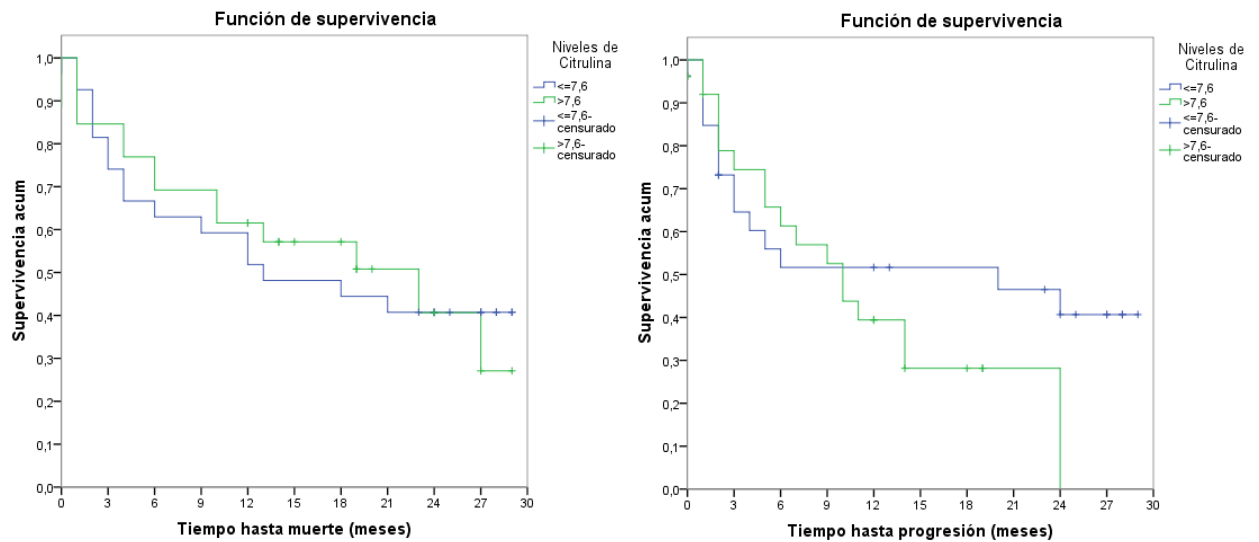


Figura 23. Distribución de los valores obtenidos para los marcadores relacionados con la permeabilidad intestinal, con factores de conversión para unificar unidades de medida entre citrulina, zonulina y endotoxina.

4.5.2 Análisis de supervivencia libre de progresión y supervivencia global

El análisis de SG y SLP según la estimación producto-límite de Kaplan-Meier, en función de las determinaciones de citrulina (figura 24), anticuerpos anticitrulina (figura 25), zonulina (figura 26) y endotoxina (figura 27), no mostró resultados estadísticamente significativos.

4.5.2.1 Citrulina



Evento Muerte							
Niveles de Citrulina	Total	N° eventos	N° censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
≤7,6 μmol/L	27	16	11	40,7%	13,00	1,55	24,45
>7,6 μmol/L	26	14	12	46,2%	23,00	8,25	37,75
Total	53	30	23	43,4%	19,00	8,44	29,56

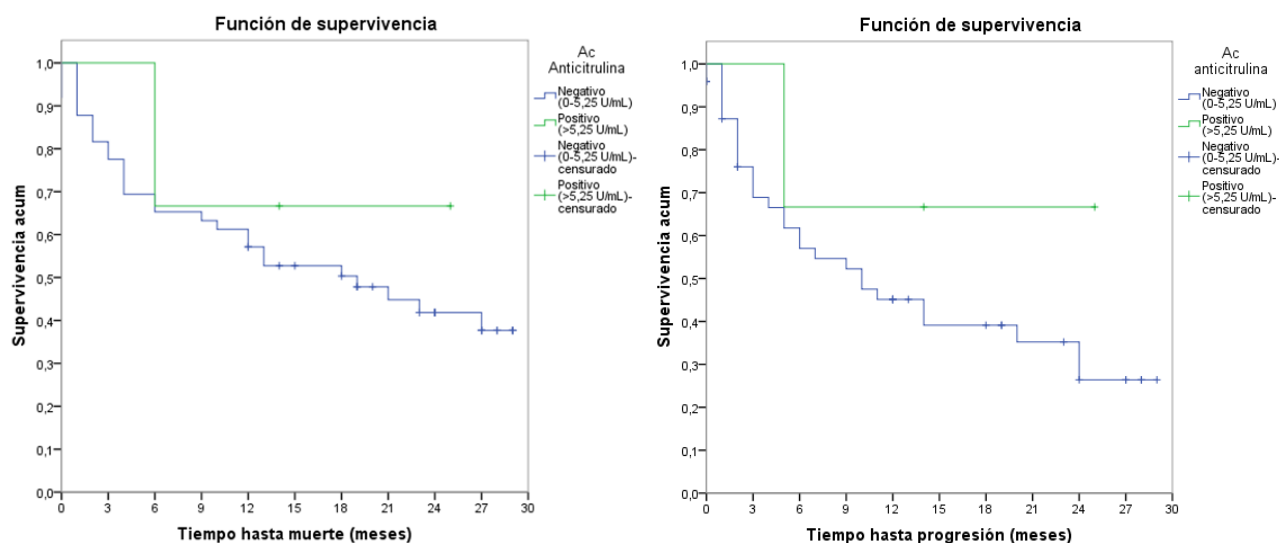
Evento Progresión							
Niveles de Citrulina	Total	N° eventos	N° censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
≤7,6 μmol/L	27	14	13	48,1%	20,00	0,00	45,25
>7,6 μmol/L	26	17	9	34,6%	10,00	5,37	14,63
Total	53	31	22	41,5%	10,00	2,95	17,05

Figura 24. Análisis de SG y SLP según los valores de citrulina.

En el gráfico de las curvas de SG y SLP según la estimación producto-límite de Kaplan-Meier por niveles de citrulina ($\leq 7,6 \mu\text{mol/L}$; $> 7,6 \mu\text{mol/L}$) se aprecia descriptivamente que entre los grupos no existen diferencias en el tiempo hasta muerte ni hasta la progresión de la enfermedad.

Para intentar extrapolar esta conclusión a nivel poblacional se utilizó el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank), concluyendo que no hay diferencias significativas entre los grupos en SG (estadístico=0,015; p-valor=0,904), ni en SLP (estadístico=1,096; p-valor=0,295).

4.5.2.2 Anticuerpos anticitrulina



Evento Muerte							
Ac. Anticitrulina	Total	Nº eventos	Nº censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
Negativo (0-5,25 U/ml)	49	28	21	42,9%	19,00	8,53	29,47
Positivo ($\geq 5,25$ U/ml)	3	1	2	66,7%	-	-	-
Total	52	29	23	44,2%	19,00	8,53	29,47

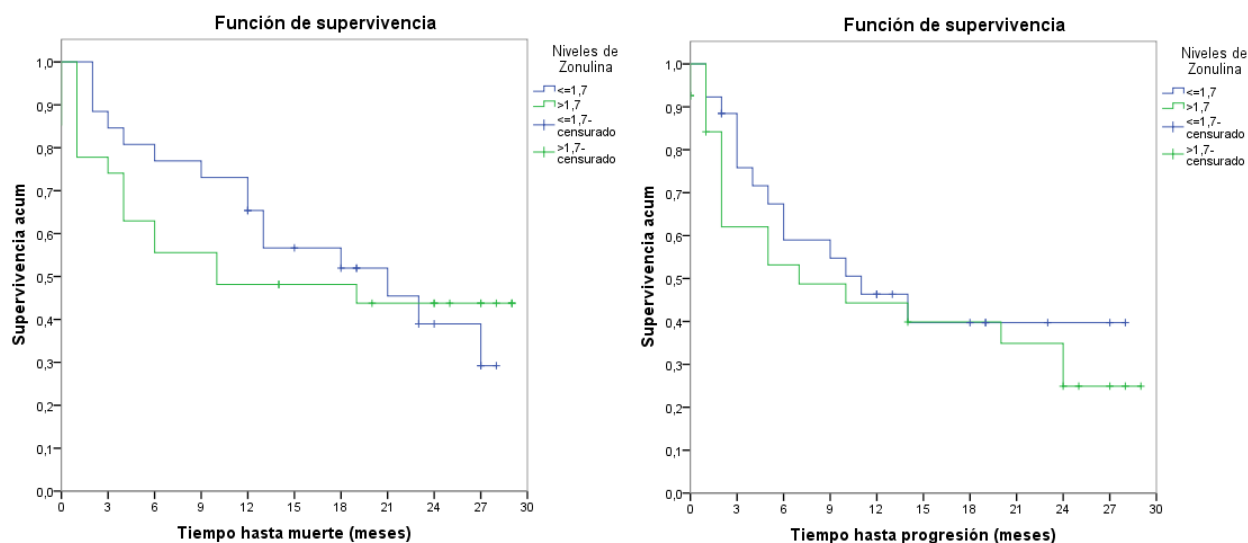
Evento Progresión							
Ac. Anticitrulina	Total	Nº eventos	Nº censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
Negativo (0-5,25 U/ml)	49	29	20	40,8%	10,00	3,33	16,67
Positivo ($> 5,25$ U/ml)	3	1	2	66,7%	-	-	-
Total	52	30	22	42,3%	10,00	2,95	17,05

Figura 25. Análisis de SG y SLP según los valores de anticuerpos anticitrulina.

En el gráfico de las curvas de SG y SLP según la estimación producto-límite de Kaplan-Meier por Ac Anticitrulina (Negativo (0-5,25 U/ml), Positivo ($\geq 5,25$ U/ml)) se aprecia descriptivamente que entre los grupos no existen diferencias en el tiempo hasta muerte ni hasta la progresión de la enfermedad.

Para extrapolar esta conclusión a nivel poblacional utilizó el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank), concluyendo que no hay diferencias significativas entre los dos grupos a nivel de SG (estadístico=0,417; p-valor=0,518), ni del SLP (estadístico=1,020; p-valor=0,312).

4.5.2.3 Zonulina



Evento Muerte							
Niveles de Zonulina	Total	N° eventos	N° censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
≤1,7 ng/ml	26	15	11	42,3%	21,00	9,09	32,91
>1,7 ng/ml	27	15	12	44,4%	10,00	0,00	30,79
Total	53	30	23	43,4%	19,00	8,44	29,56

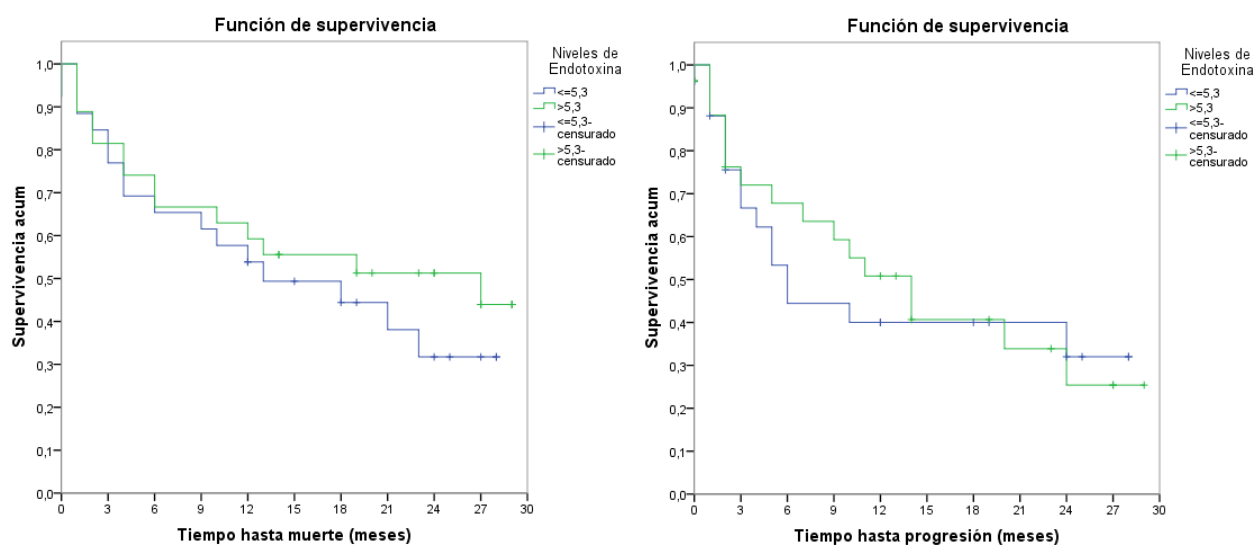
Evento Progresión							
Niveles de Zonulina	Total	N° eventos	N° censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
≤1,7 ng/ml	26	14	12	46,2%	11,00	2,71	19,29
>1,7 ng/ml	27	17	10	37,0%	7,00	0,00	16,23
Total	53	31	22	41,5%	10,00	2,95	17,05

Figura 26. Análisis de SG y SLP según los valores de zonulina.

En el gráfico de las curvas de SG y SLP según la estimación producto-límite de Kaplan-Meier por niveles de zonulina ($\leq 1,7$ ng/ml; $> 1,7$ ng/ml) se aprecia descriptivamente que entre los grupos no existen diferencias en el tiempo hasta la muerte ni hasta la progresión de la enfermedad.

Para extrapolar esta conclusión a nivel poblacional utilizó el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank), y se concluye que no hay diferencias significativas entre los grupos a nivel de SG (estadístico=0,076; p-valor=0,783), ni de SLP (estadístico=0,525; p-valor=0,469).

4.5.2.4 Endotoxina



Evento Muerte							
Niveles de Endotoxina	Total	N° eventos	N° censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
≤5,3 UE/ml	26	16	10	38,5%	13,00	1,26	24,74
>5,3 UE/ml	27	14	13	48,1%	27,00	1,56	52,44
Total	53	30	23	43,4%	19,00	8,44	29,56

Evento Progresión							
Niveles de Endotoxina	Total	N° eventos	N° censurado	% censurado	Mediana	I.C. L.I.	I.C. L.S.
≤5,3 UE/ml	26	15	11	42,3%	6,00	3,71	8,29
>5,3 UE/ml	27	16	11	40,7%	14,00	8,35	19,65
Total	53	31	22	41,5%	10,00	2,95	17,05

Figura 27. Análisis de SG y SLP según los valores de endotoxina.

En el gráfico de las curvas de SG y SLP según la estimación producto-límite de Kaplan-Meier por Niveles de Endotoxina ($\leq 5,3$ UE/ml; $> 5,3$ UE/ml) se aprecia descriptivamente que entre los grupos tampoco existen diferencias en el tiempo hasta la muerte ni en el tiempo hasta la progresión de la enfermedad.

Para extrapolar esta conclusión a nivel poblacional se utilizó el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank), concluyendo que no hay diferencias significativas entre los grupos para SG (estadístico=0,643; p-valor=0,423), ni para la SLP (estadístico=0,040; p-valor=0,842).

4.5.3 Análisis estadístico integrador

Por último, se realizó un análisis exhaustivo que incluyó todas las variables analíticas y clínicas (Figura 28); sin embargo, no se identificaron marcadores predictivos de respuesta a ICI o aparición de irAEs, y no hubo correlaciones entre la abundancia bacteriana, densidad de AGCC y/o los parámetros de permeabilidad.

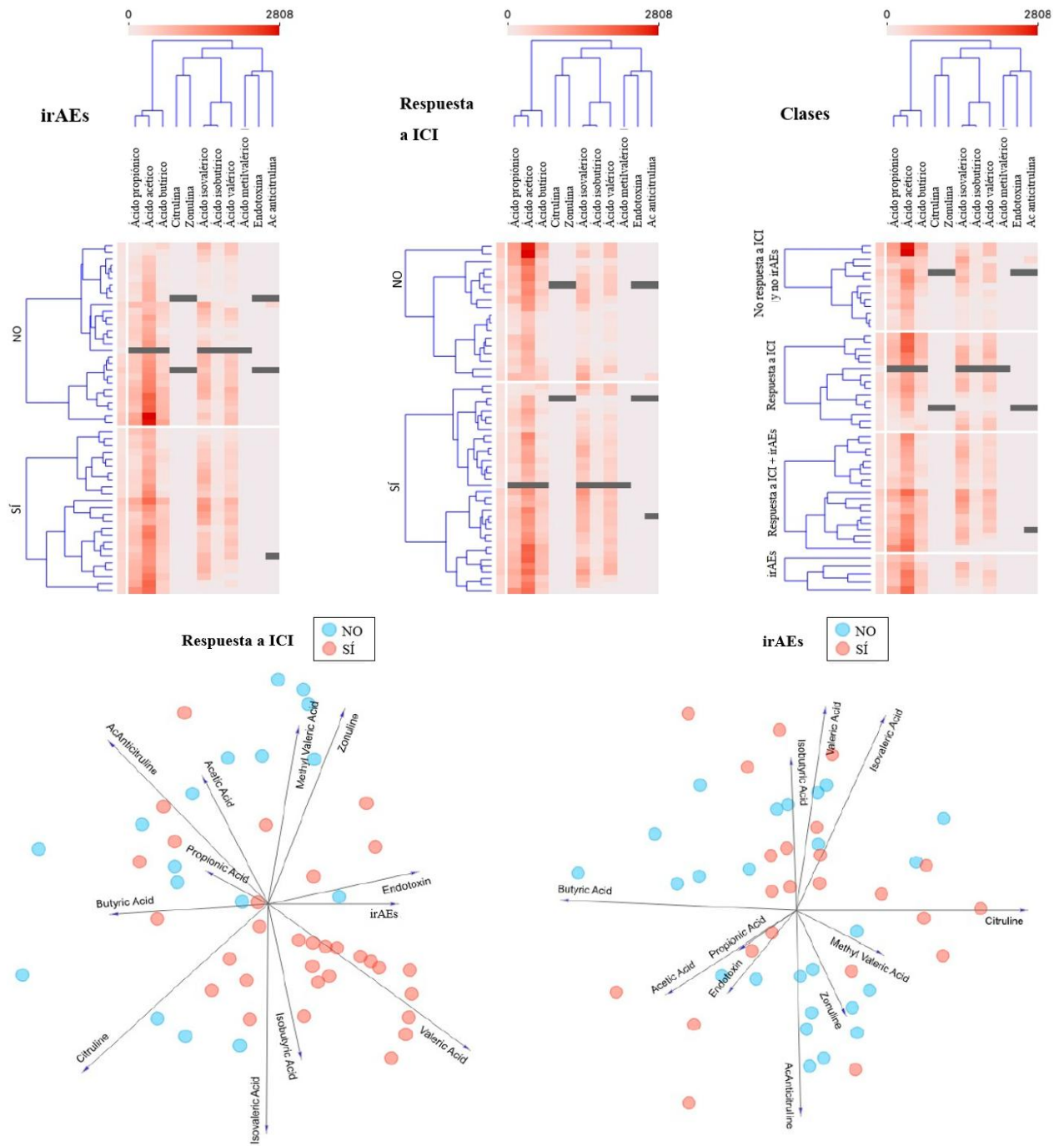


Figura 28. Análisis estadístico integrador que incluye todas las variables clínicas y analíticas del estudio.

5. Discusión

Dado el uso actual de los tratamientos con inmunoterapia en Oncología Médica, con resultados muy divergentes entre los diferentes tipos de cáncer y aparición de irAEs, la investigación de biomarcadores predictivos de respuesta a estas terapias es actualmente una prioridad.

A pesar de que numerosos estudios han analizado varios posibles biomarcadores para predecir la respuesta al tratamiento y el posible desarrollo de irAEs, pocos de ellos han demostrado potencial, además de ciertas limitaciones para llevar a cabo la selección de aquellos pacientes que obtendrían un mayor beneficio de este tratamiento (117).

La respuesta inmunológica está modulada no sólo por la localización de la lesión tumoral local sino también por varias regiones del organismo, incluido el intestino (foco de nuestro estudio), donde las respuestas inmunes locales y sistémicas están moduladas por un estrecho diálogo con la microbiota (118,119). Los diversos factores del microambiente intestinal del huésped que se han propuesto como modificadores de la respuesta inmunitaria antitumoral y, específicamente, la respuesta a los ICI en el cáncer de pulmón de célula no pequeña, incluyen la microbiota y, (considerablemente menos explorados), los AGCC y los marcadores de barrera epitelial.

Nuestro primer enfoque fue llevar a cabo la determinación de la composición bacteriana y la abundancia diferencial de taxones en heces, que ya ha sido explorada por otros autores (120,121), sin resultados concluyentes hasta ahora en pacientes con cáncer de pulmón.

Los valores de diversidad alfa fueron comparables en todos los pacientes y sugirieron un ecosistema microbiano diverso y rico, con valores medianos de 5,5 y 13 para los índices de PD de Shannon (abundancia relativa de taxa) y Faith (número de especies y cuánto se parecen estas especies filogenéticamente), respectivamente.

El análisis LEfSe señaló taxones específicos que diferenciaban a los respondedores a ICI, con una mayor abundancia de *Clostridia* combinada con una menor riqueza de *Hungatella*; y la población en la que se desarrollaban irAEs, con mayor cantidad de *Beta-proteobacteria* en detrimento de *Negativicutes*.

Nuestros resultados concuerdan con hallazgos previos de estudios en pacientes con melanoma y otros tumores sólidos tratados con ICI en los que los respondedores al tratamiento presentaron un enriquecimiento de *Clostridiales* a nivel intestinal, en comparación con un aumento de *Hungatella* en los no respondedores (122). Derosa *et al.* y Routy *et al.* informaron de una correlación entre la respuesta ICI y la abundancia de *Akkermansia* (63,123), que fue confirmada recientemente por un estudio independiente (124). Curiosamente, este género no estaba representado en casi la mitad de nuestros pacientes y era un género minoritario en el resto de ellos. Otros estudios en melanoma (125) y otros tumores sólidos, incluido el cáncer de pulmón (118), no han demostrado correlación entre *Akkermansia* y las respuestas de ICI.

La mayoría de los estudios publicados anteriormente sobre microbiota y enfermedades humanas han tenido como objetivo prioritario la identificación de una bacteria específica como la principal contribuyente; sin embargo, estos resultados a menudo no son

reproducibles en estudios posteriores con diferentes pacientes o condiciones. Por lo tanto, a pesar de varias décadas de estudios sobre microbiota, no se han identificado aún marcadores específicos y universales para cada enfermedad.

Un estudio realizado por investigadores de la Universidad China de Hong Kong recientemente publicado por Lin et al (126), analiza cómo la microbiota intestinal influye en la respuesta a ICI en pacientes con diferentes tipos de cáncer. Se identificaron especies microbianas trans-reino, como las bacterias *Faecalibacterium prausnitzii* y *Coprococcus comes*, y *Nemania serpens* y *Hyphopichia pseudoburtonii*, enriquecidas en los respondedores a ICI. Estas especies mostraron efectos inmunomoduladores al influir en la actividad de las células T CD8+ tanto in vitro como en modelos de ratones. Además, se desarrollaron paneles de biomarcadores microbianos que predicen la respuesta a ICI con alta precisión en pacientes con melanoma metastásico, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y cáncer renal. Los resultados fueron validados en cohortes independientes, demostrando que estos biomarcadores pueden mejorar la predicción de la respuesta a la inmunoterapia. Este estudio también destaca la importancia de considerar no solo las bacterias, sino también otros microbios como eucariotas, arqueas y virus en la investigación de la respuesta a ICI. Aunque el estudio tiene limitaciones, como la falta de diversidad geográfica en las cohortes, proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre el papel de la microbiota intestinal en la inmunoterapia contra el cáncer.

Otro estudio reciente aboga por el análisis del potencial papel pronóstico y operativo de la microbiota intratumoral en el CPCNP mediante secuenciación de 16S rRNA y RNA (127). Se analizaron muestras de tejido canceroso y tejido sano adyacente de 30 pacientes con CPCNP. Se identificaron diferencias significativas en la composición microbiana entre los tejidos cancerosos y normales, especialmente en el carcinoma de células escamosas. Se encontraron cuatro filos, cinco clases, nueve órdenes, 17 familias y 36 géneros asociados con el pronóstico de CPCNP. Globalmente se identificaron dos grupos microbianos diferenciados: uno protector, relacionado con la recurrencia tardía, y otro perjudicial, asociado con una menor supervivencia y recurrencia temprana. *Peptococcus* destacó como un factor pronóstico independiente y perjudicial, posiblemente afectando el pronóstico a través de la señalización del factor de necrosis tumoral. El estudio sugiere que la microbiota intratumoral puede desempeñar un papel crucial en la patogénesis de CPCNP. Estos hallazgos proporcionan nuevas perspectivas para futuras investigaciones y estrategias de tratamiento.

Tales son los avances en investigación en este campo, que se están comenzando a desarrollar ensayos clínicos en este sentido. El NCT06403111 (128), es un estudio que presenta un ensayo prospectivo, multicéntrico y exploratorio con la intención de evaluar la combinación de trasplante de microbiota fecal (FMT) con quimioterapia basada en platino y tislelizumab como tratamiento de primera línea en pacientes con CPCNP avanzado sin mutaciones accionables. La combinación de inmunoterapia con quimioterapia es el estándar actual de tratamiento en este grupo de pacientes, pero la resistencia primaria o adquirida sigue siendo un desafío. Se ha demostrado que la microbiota intestinal modula el microambiente tumoral e influye en la respuesta a la inmunoterapia, lo que ha conducido a la inclusión del FMT en este estudio. El ensayo, registrado como FMT-JSNO-02 (NCT06403111), incluirá 62 pacientes con CPCNP

avanzado, estado funcional ECOG 0-1 y expresión de PD-L1 <50%. Recibirán FMT mediante cápsulas orales en combinación con quimioterapia e inmunoterapia. El objetivo primario es evaluar la tasa de supervivencia libre de progresión a los 12 meses. También se analizarán biomarcadores, diversidad del microbioma y calidad de vida. Aunque el diseño de brazo único limita la comparación con un grupo control, los resultados podrían aportar evidencia sobre el potencial del FMT para mejorar la eficacia del tratamiento estándar en CPCNP avanzado.

La genética bacteriana permite el intercambio en las vías metabólicas, desplazando así el foco de la investigación desde la composición en exclusiva, hacia el estudio del metabolismo del ecosistema global, en lugar de la abundancia de taxones individuales. Los AGCC, metabolitos exclusivamente bacterianos producidos a través de la fermentación de fibras no digeribles, han sido implicados en numerosas afecciones médicas, incluso en el CPCNP, aunque se desconoce su correlación con la respuesta a la ICI (129,130). Los AGCC contribuyen a regular la motilidad intestinal, la función de barrera, el metabolismo del huésped y la distribución de la microbiota.

Dentro de los AGCC, el butirato es el más estrechamente relacionado con los procesos oncológicos y se ha propuesto como un inhibidor de la proliferación de células cancerosas, con efectos antineoplásicos directos debido a las interacciones con las HDAC (77,131). También se ha postulado que la administración de propionato pudiera tener potencial terapéutico para reducir la agresividad del CPCNP y justifica una mayor investigación al respecto (132). A nivel local pulmonar, estos ácidos podrían estimular las células T reguladoras, las células T colaboradoras 2 y las células linfoides innatas tipo 3 con interleucina 22+ como mecanismo protector ante la inflamación de las vías respiratorias a través de la señalización del receptor de células T (133). Al modular las HDAC, los AGCC podrían modificar no solo la actividad de las células dendríticas (134), sino también de los monocitos (135), neutrófilos (136) y macrófagos (137). Incluso se postula que podrían ser un nuevo enfoque para mejorar la citotoxicidad de las células NK, incipientes en el tratamiento de los tumores sólidos (138).

Recientemente se han informado que los ácidos acético, propiónico y butírico son los principales AGCC en las heces, con una distribución de 60:20:20 (139), siendo esta representación comparable a nuestros resultados (56:19:11). A pesar de nuestro sólido análisis de datos, no se detectaron correlaciones entre los diferentes AGCC y las bacterias catalogadas o la respuesta ICI, lo que contrasta con los resultados de Nomura *et al.*, quienes observaron que un aumento en los AGCC fecales se correlacionaba con la SLP en tumores sólidos (92). Aún no se dispone de metodologías estandarizadas ni de valores normales para los AGCC, lo que dificulta las comparaciones. Nuestro estudio se ha centrado en el CPCNP, a diferencia del estudio de Nomura *et al.* (92), en el que la mitad de la muestra eran pacientes con melanoma y solo estaban representados dos pacientes con cáncer de pulmón. Cabe destacar también que muchos de los pacientes incluidos en el estudio de Nomura *et al.* correspondían a tumores sólidos en los que la eficacia de los ICI era deficiente en el momento del desarrollo del estudio, como tumores del área de cabeza y cuello, del tracto gastrointestinal o genitourinarios.

Un estudio reciente de Luan *et al.* (140), ha analizado el papel del metabolismo del butirato en el adenocarcinoma de pulmón y su impacto en la progresión tumoral y la

respuesta inmunitaria. Se identificaron 51 genes diferencialmente expresados relacionados con el metabolismo del butirato. De estos, cinco genes (CPS1, ABCC2, CDKN3, SLC2A1 e IGFBP1) se seleccionaron para desarrollar una firma pronóstica. El análisis reveló que los pacientes con puntuaciones de riesgo altas tenían peor supervivencia y una mayor expresión de puntos de control inmunitarios como PD-L1, PD-L2 y PD-1, sugiriendo un posible beneficio del tratamiento con inmunoterapia en este subgrupo. También se observó una correlación con la resistencia a fármacos como cisplatino, paclitaxel y docetaxel en el grupo de alto riesgo. Además, se validó la función de CDKN3 en la proliferación y migración de células tumorales mediante experimentos *in vitro*. La inhibición de CDKN3 redujo significativamente la proliferación y la invasión celular, posicionándolo como un potencial objetivo terapéutico. El estudio sugiere que la firma basada en genes del metabolismo del butirato, particularmente CDKN3, podría servir como biomarcador pronóstico y potencial diana terapéutica en CPCNP especialmente adenocarcinoma.

Junto con el análisis de los AGCC, la principal contribución de nuestro trabajo es la exploración detallada de la permeabilidad de la barrera intestinal, que apenas se ha investigado en el CPCNP como un factor dependiente del huésped. Hoy en día, aún existe una falta significativa de procedimientos estandarizados y valores de punto de corte para determinar dicha permeabilidad.

Nuestros resultados muestran una baja dispersión en las cuatro variables analizadas (citrulina, anticuerpos anticitrulina, zonulina y endotoxina), lo que disminuye la probabilidad de identificar biomarcadores para la respuesta a la ICI y la aparición de irAEs.

La mayoría de los estudios previos en este contexto han demostrado el efecto de las endotoxinas en las células de CPCNP *in vitro* o en modelos animales. Sin embargo, hasta donde conocemos, el nuestro es el primer informe de los niveles circulantes de endotoxina en pacientes con CPCNP diferenciados por subgrupos según la respuesta a la ICI y la aparición de irAEs.

La principal limitación de nuestro estudio es la falta de consenso sobre los aspectos metodológicos y los valores normales de las mediciones, dada la novedad científica de las mismas. No obstante, hemos explorado el microambiente del tracto intestinal como una posible fuente de biomarcadores debido a su falta hasta el momento en otros compartimentos (141,142). Además, el tamaño muestral es limitado, y el estudio es unicéntrico y sin contar con una cohorte control.

La principal fortaleza de este trabajo es que se trata de un estudio exhaustivo de microbiota fecal en pacientes con CPNCP que reciben tratamiento con inmunoterapia, así como el análisis pionero de los AGCC en heces y los factores de permeabilidad intestinal, analizando su potencial relación con la respuesta al tratamiento y el desarrollo de toxicidad inmunorrelacionada, llevado a cabo de forma prospectiva.

6. Conclusiones

1. La SG fue superior en el grupo de pacientes que respondió al tratamiento con ICI, $p < 0.05$ (IC 18,15-35,85).
2. No se alcanzó la significación estadística en el estudio de SG y su relación con el desarrollo de irAEs, $p = 0.051$ (IC 11,13- 26,87).
3. Se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en la SLP de los pacientes respondedores a ICI ($p < 0.05$, IC 2,81-17,19) y en aquellos que presentaron irAEs ($p < 0.05$, IC 2,81-17,19).
4. La tasa de desarrollo de irAEs fue similar para ambas histologías: adenocarcinoma (52%) y carcinoma escamoso (48%).
5. En nuestro estudio, los niveles de expresión de PD-L1 no se correlacionan estrictamente con la respuesta al tratamiento con inmunoterapia.
6. La composición de la microbiota intestinal, considerando las diversidades alfa y beta, fue comparable en todos los pacientes, independientemente de su respuesta a ICI o aparición de irAEs.
7. El análisis LEfSe mostró diferencias estadísticamente significativas para el filo Bacillota, incluyendo una mayor abundancia de *Clostridia* y *Monoglobus* en los respondedores a ICI, y *Hungatella* en los no respondedores.
8. Los pacientes que desarrollaron irAEs presentaron una abundancia significativamente mayor de Beta-proteobacteria y *Enterococcus*, haciéndolo en detrimento de *Negativicutes* y otros géneros del filo Bacillota.
9. Los AGCC con mayor presencia global en los pacientes fueron ácido acético (56%), propiónico (19%) y butírico (11%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta a ICI o el desarrollo de irAEs.
10. El análisis de SG y SLP en función de las determinaciones de citrulina, anticuerpos anticitrulina, zonulina y endotoxina, no mostró resultados estadísticamente significativos.
11. En el presente estudio, no hemos encontrado marcadores relacionados con la permeabilidad del tracto gastrointestinal, la composición del microbioma o los AGCC que pudieran contribuir a predecir la respuesta a ICI o la aparición de irAEs. Sin embargo, estos datos podrían ayudar a otros investigadores a seguir explorando el tracto intestinal como posible fuente de biomarcadores, ya que se incluyen características que no han sido analizadas previamente.

7. Retos y perspectivas futuras

La interacción entre la microbiota y el hospedador puede atribuirse a su participación en el metabolismo y las funciones inmunitarias del huésped. Por lo tanto, una mejor comprensión de los potenciales mecanismos por los cuales la microbiota afecta a la aparición y el desarrollo del cáncer de pulmón, así como la respuesta a la inmunoterapia, serían clave para establecer el pronóstico del cáncer de pulmón y mejorar la eficacia y seguridad de este tratamiento. La identificación de marcadores circulantes de la integridad de la barrera epitelial podría ser muy útil para monitorizar la progresión del cáncer y la eficacia del tratamiento.

8. Agradecimientos

Agradecer a los pacientes y al Biobanco del Sistema Aragonés de Salud integrado en la Red Nacional de Biobancos de España (PT20/00112) por su colaboración; al Instituto de Carboquímica (ICB-CSIC) de Zaragoza por el estudio de los factores de permeabilidad intestinal; al Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria por su contribución en las determinaciones de AGCC y estudio de la microbiota, en especial a Rosa del Campo por acogerme en su laboratorio y permitirme el desarrollo de este trabajo; a mis directoras de tesis, siempre disponibles para ayudar y poder llevar a cabo el estudio de manera óptima; y a todo el equipo de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza por la calidad asistencial y en particular, el esfuerzo y compromiso con la investigación en pacientes con cáncer de pulmón.

9. Bibliografía

1. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018 553:7689. 2018 Jan 25;553(7689):446–54.
2. Skoulidis F, Heymach J V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer* 2019 19:9. 2019 Aug 12;19(9):495–509.
3. CUSABIO team. What You Have To Know about Lung Cancer. [Internet]. [cited 2024 Nov 25]. Available from: <https://www.cusabio.com/c-21095.html>
4. Inhibidores de puntos de control inmunitario [Internet]. [cited 2024 Nov 25]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/inhibidores-de-puntos-de-control>
5. Risk factors | Thoracic Tumours [Internet]. [cited 2024 Nov 25]. Available from: <https://oncologypro.esmo.org/education-library/esmo-books/essentials-for-clinicians/thoracic-tumours/risk-factors>
6. El cáncer en cifras | SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica [Internet]. [cited 2025 Mar 18]. Available from: <https://seom.org/prensa/el-cancer-en-cifras>
7. Motadi LR, Misso NL, Dlamini Z, Bhoola KD. Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: therapeutic targets. *Int Immunopharmacol*. 2007 Dec 20;7(14):1934–47.
8. Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014 Nov 1;9(11):1618–24.
9. Rami-Porta R, Asamura H, Travis WD, Rusch VW. Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):138–55.
10. Goldstraw P, Crowley JJ. The International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Project on Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006 May 1;1(4):281–6.
11. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg*. 2018 Aug 1;8(7):709.
12. Alexander M, Kim SY, Cheng H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*. 2020 Dec 1;198(6):897–907.
13. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018 Dec 13;379(24):2342–50.
14. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Oct 22;373(17):1627–39.
15. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jul 9;373(2):123–35.

16. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016 Apr 9;387(10027):1540–50.
17. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*. 2017 Jan 21;389(10066):255–65.
18. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 May 31;378(22):2078–92.
19. Brahmer JR, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Health-related quality-of-life results for pembrolizumab versus chemotherapy in advanced, PD-L1-positive NSCLC (KEYNOTE-024): a multicentre, international, randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Dec 1;18(12):1600–9.
20. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jun 14;378(24):2288–301.
21. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *New England Journal of Medicine*. 2018 May 31;378(22):2093–104.
22. Reck M, Remon J, Hellmann MD. First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2022 Feb 20;40(6):586–97.
23. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Dec 6;379(23):2220–9.
24. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, et al. Durvalumab plus platinum–etoposide versus platinum–etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2019 Nov 23;394(10212):1929–39.
25. Spigel DR, Cheng Y, Cho BC, Laktionov KK, Fang J, Chen Y, et al. ADRIATIC: Durvalumab (D) as consolidation treatment (tx) for patients (pts) with limited-stage small-cell lung cancer (LS-SCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2024 Jun 5;42(17_suppl):LBA5–LBA5.
26. Gagné A, Wang E, Bastien N, Orain M, Desmeules P, Pagé S, et al. Impact of Specimen Characteristics on PD-L1 Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: Validation of the IASLC PD-L1 Testing Recommendations. *J Thorac Oncol*. 2019 Dec 1;14(12):2062–70.
27. Suda K, Mitsudomi T. Inter-tumor heterogeneity of PD-L1 status: is it important in clinical decision making? *J Thorac Dis*. 2020 May 1;12(5):1770.
28. Saito Y, Horiuchi S, Morooka H, Ibi T, Takahashi N, Ikeya T, et al. Inter-tumor heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2019 Dec 1;11(12):4982–91.

29. Nicoś M, Krawczyk P, Crosetto N, Milanowski J. The Role of Intratumor Heterogeneity in the Response of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Oncol.* 2020 Dec 4;10.
30. Alexander M, Kim SY, Cheng H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung.* 2020 Dec 1;198(6):897–907.
31. Mamdani H, Matosevic S, Khalid AB, Durm G, Jalal SI. Immunotherapy in Lung Cancer: Current Landscape and Future Directions. *Front Immunol.* 2022 Feb 9;13.
32. Goulart BHL, Mushti SL, Chatterjee S, Larkins E, Mishra-Kalyani PS, Pazdur R, et al. Correlations of response rate and progression-free survival with overall survival in immunotherapy trials for metastatic non-small-cell lung cancer: an FDA pooled analysis. *Lancet Oncol.* 2024 Apr 1;25(4):455–62.
33. Martins F, Sofiya L, Sykiotis GP, Lamine F, Maillard M, Fraga M, et al. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 16:9. 2019 May 15;16(9):563–80.
34. Curran WJ, Paulus R, Langer CJ, Komaki R, Lee JS, Hauser S, et al. Sequential vs. concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: randomized phase III trial RTOG 9410. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Oct 5;103(19):1452–60.
35. Steuer CE, Behera M, Ernani V, Higgins KA, Saba NF, Shin DM, et al. Comparison of Concurrent Use of Thoracic Radiation With Either Carboplatin-Paclitaxel or Cisplatin-Etoposide for Patients With Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* 2017 Aug 1;3(8):1120–9.
36. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2017 Nov 16;377(20):1919–29.
37. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2016 Nov 10;375(19):1823–33.
38. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2018 May 31;378(22):2078–92.
39. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *New England Journal of Medicine.* 2018 Jun 14;378(24):2288–301.
40. Horinouchi H, Nogami N, Saka H, Nishio M, Tokito T, Takahashi T, et al. Pembrolizumab plus pemetrexed-platinum for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer: KEYNOTE-189 Japan Study. *Cancer Sci.* 2021 Aug 1;112(8):3255–65.
41. Socinski MA, Nishio M, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, et al. IMpower150 Final Overall Survival Analyses for Atezolizumab Plus Bevacizumab and Chemotherapy in First-Line Metastatic Nonsquamous NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021 Nov 1;16(11):1909–24.
42. Vemuri R, Gundamaraju R, Shastri MD, Shukla SD, Kalpurath K, Ball M, et al. Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *Biomed Res Int.* 2018;2018.

43. Chikina A, Matic Vignjevic D. At the right time in the right place: How do luminal gradients position the microbiota along the gut? *Cells & development*. 2021 Dec 1;168.
44. Goto T. Microbiota and lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2022 Nov 1;86:1–10.
45. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nature Reviews Microbiology* 2016 15:1. 2016 Oct 3;15(1):55–63.
46. Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nature Immunology* 2019 20:10. 2019 Sep 9;20(10):1279–90.
47. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. *Mucosal Immunol*. 2019 Jul 1;12(4):843–50.
48. Galazzo G, van Best N, Bervoets L, Dapaah IO, Savelkoul PH, Hornef MW, et al. Development of the Microbiota and Associations With Birth Mode, Diet, and Atopic Disorders in a Longitudinal Analysis of Stool Samples, Collected From Infancy Through Early Childhood. *Gastroenterology*. 2020 May 1;158(6):1584–96.
49. Haak BW, Littmann ER, Chaubard JL, Pickard AJ, Fontana E, Adhi F, et al. Impact of gut colonization with butyrate-producing microbiota on respiratory viral infection following allo-HCT. *Blood*. 2018 Jun 6;131(26):2978.
50. Zhuang H, Cheng L, Wang Y, Zhang YK, Zhao MF, Liang G Da, et al. Dysbiosis of the gut microbiome in lung cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Apr 18;9(APR):441490.
51. Mao Q, Jiang F, Yin R, Wang J, Xia W, Dong G, et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Lett*. 2018 Feb 28;415:40–8.
52. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):91–7.
53. Gori S, Inno A, Belluomini L, Bocus P, Bisoffi Z, Russo A, et al. Gut microbiota and cancer: How gut microbiota modulates activity, efficacy and toxicity of antitumoral therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Nov 1;143:139–47.
54. Toor D, Wasson MK, Kumar P, Karthikeyan G, Kaushik NK, Goel C, et al. Dysbiosis Disrupts Gut Immune Homeostasis and Promotes Gastric Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 May 2;20(10).
55. Nakatsu G, Li X, Zhou H, Sheng J, Wong SH, Wu WKK, et al. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nature Communications* 2015 6:1. 2015 Oct 30;6(1):1–9.
56. Boleij A, Van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* Infection Among Colorectal Cancer Patients: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2011 Nov 1;53(9):870–8.
57. Ulger Toprak N, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006 Aug 1;12(8):782–6.
58. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1016.

59. Carbone C, Piro G, Di Noia V, D'Argento E, Vita E, Ferrara MG, et al. Lung and Gut Microbiota as Potential Hidden Driver of Immunotherapy Efficacy in Lung Cancer. *Mediators Inflamm.* 2019;2019.
60. Pinato DJ, Howlett S, Ottaviani D, Urus H, Patel A, Mineo T, et al. Association of Prior Antibiotic Treatment With Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Cancer. *JAMA Oncol.* 2019 Dec 1;5(12):1774–8.
61. Jin Y, Dong H, Xia L, Yang Y, Zhu Y, Shen Y, et al. The Diversity of Gut Microbiome is Associated With Favorable Responses to Anti–Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology.* 2019 Aug 1;14(8):1378–89.
62. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T V., et al. Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2018 Jan 1;359(6371):97.
63. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018 Jan 5;359(6371):91–7.
64. Ramírez-Labrada AG, Isla D, Artal A, Arias M, Rezusta A, Pardo J, et al. The Influence of Lung Microbiota on Lung Carcinogenesis, Immunity, and Immunotherapy. *Trends Cancer.* 2020 Feb 1;6(2):86–97.
65. Lee WJ, Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat Chem Biol.* 2014;10(6):416–24.
66. Zheng X, Xie G, Zhao A, Zhao L, Yao C, Chiu NHL, et al. The footprints of gut microbial-mammalian co-metabolism. *J Proteome Res.* 2011 Dec 2;10(12):5512–22.
67. Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. *Immunity.* 2014 Jun 19;40(6):833–42.
68. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol.* 2014;121:91–119.
69. Yoo JY, Groer M, Dutra SVO, Sarkar A, McSkimming DI. Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms.* 2020 Oct 1;8(10):1–22.
70. Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Sawaki E, et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep.* 2012;2.
71. Blacher E, Levy M, Tatirovsky E, Elinav E, Schwartz V, Markovitz G, et al. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *The Journal of Immunology.* 2017 Jan 15;198(2):572–80.
72. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Dec;217(2):133–9.
73. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1031–64.
74. Donohoe DR, Wali A, Brylawski BP, Bultman SJ. Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PLoS One.* 2012 Sep 28;7(9).

75. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 2011 May 4;13(5):517–26.
76. Sanderson IR. Short chain fatty acid regulation of signaling genes expressed by the intestinal epithelium. *J Nutr.* 2004;134(9).
77. Hajjar R, Richard CS, Santos MM. The role of butyrate in surgical and oncological outcomes in colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2021;320(4):G601–8.
78. Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2019 4:1. 2019 Oct 12;4(1):1–34.
79. Gaudier E, Jarry A, Blotière HM, De Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Dec;287(6).
80. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 2013 May 21;11.
81. Ney LM, Wipplinger M, Grossmann M, Engert N, Wegner VD, Mosig AS. Short chain fatty acids: key regulators of the local and systemic immune response in inflammatory diseases and infections. *Open Biol.* 2023;13(3).
82. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, Van Der Veeken J, Deroos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451–5.
83. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013;341(6145):569–73.
84. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014 Jan 16;40(1):128–39.
85. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, MacIa L, Mason LJ, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun.* 2015 Jun 23;6.
86. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem.* 2011 Sep;22(9):849–55.
87. Chrysostomou D, Roberts LA, Marchesi JR, Kinross JM. Gut Microbiota Modulation of Efficacy and Toxicity of Cancer Chemotherapy and Immunotherapy. *Gastroenterology.* 2023 Feb 1;164(2):198–213.
88. Tomita Y, Ikeda T, Sakata S, Saruwatari K, Sato R, Iyama S, et al. Association of probiotic *clostridium butyricum* therapy with survival and response to immune checkpoint blockade in patients with lung cancer. *Cancer Immunol Res.* 2020 Oct 1;8(10):1236–42.

89. Ashique S, De Rubis G, Sirohi E, Mishra N, Rihan M, Garg A, et al. Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. *Chem Biol Interact.* 2022 Dec 1;368.
90. Kim K, Kwon O, Ryu TY, Jung CR, Kim J, Min JK, et al. Propionate of a microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle arrest in lung cancer. *Mol Med Rep.* 2019;20(2):1569–74.
91. Botticelli A, Vernocchi P, Marini F, Quagliariello A, Cerbelli B, Reddel S, et al. Gut metabolomics profiling of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients under immunotherapy treatment. *J Transl Med.* 2020 Feb 3;18(1).
92. Nomura M, Nagatomo R, Doi K, Shimizu J, Baba K, Saito T, et al. Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw Open.* 2020 Apr 1;3(4):e202895.
93. Sánchez-Alcoholado L, Laborda-Illanes A, Otero A, Ordóñez R, González-González A, Plaza-Andrades I, et al. Relationships of Gut Microbiota Composition, Short-Chain Fatty Acids and Polyamines with the Pathological Response to Neoadjuvant Radiochemotherapy in Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 1;22(17).
94. Bingula R, Filaire M, Radosevic-Robin N, Bey M, Berthon JY, Bernalier-Donadille A, et al. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J Oncol.* 2017;2017.
95. Ocariz-Diez M, Cruellas M, Gascón M, Lastra R, Martínez-Lostao L, Ramírez-Labrada A, et al. Microbiota and Lung Cancer. Opportunities and Challenges for Improving Immunotherapy Efficacy. *Front Oncol.* 2020 Sep 24;10.
96. Mörkl S, Lackner S, Meinitzer A, Mangge H, Lehofer M, Halwachs B, et al. Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur J Nutr.* 2018 Dec 1;57(8):2985.
97. Fortea M, Albert-Bayo M, Abril-Gil M, Ganda Mall JP, Serra-Ruiz X, Henao-Paez A, et al. Present and Future Therapeutic Approaches to Barrier Dysfunction. *Front Nutr.* 2021 Oct 28;8:718093.
98. Curis E, Crenn P, Cynober L. Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007 Sep;10(5):620–6.
99. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clinical Nutrition.* 2008 Jun 1;27(3):328–39.
100. Ouaknine Krief J, Helly De Tauriers P, Dumenil C, Neveux N, Dumoulin J, Giraud V, et al. Role of antibiotic use, plasma citrulline and blood microbiome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *J Immunother Cancer.* 2019 Jul 10;7(1).
101. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T V., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2018 Jan 5;359(6371):97–103.
102. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 9;106(39):16799.

103. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000 Apr 29;355(9214):1518–9.
104. Miranda-Ribera A, Ennamorati M, Serena G, Cetinbas M, Lan J, Sadreyev RI, et al. Exploiting the Zonulin Mouse Model to Establish the Role of Primary Impaired Gut Barrier Function on Microbiota Composition and Immune Profiles. *Front Immunol*. 2019 Sep 19;10:2233.
105. Ajamian M, Steer D, Rosella G, Gibson PR. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PLoS One*. 2019 Jan 1;14(1).
106. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2019 Sep 13;16(1):180.
107. Bowser SM, McMillan RP, Boutagy NE, Tarpey MD, Smithson AT, Osterberg KL, et al. Serum endotoxin, gut permeability and skeletal muscle metabolic adaptations following a short term high fat diet in humans. *Metabolism*. 2020 Feb 1;103.
108. Dall’Olio FG, Maggio I, Massucci M, Mollica V, Fragomeno B, Ardizzoni A. ECOG performance status ≥ 2 as a prognostic factor in patients with advanced non small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors-A systematic review and meta-analysis of real world data. *Lung Cancer*. 2020 Jul 1;145:95–104.
109. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019 Jan 25;21(1):3–17.
110. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2018 Oct 1;29:iv192–237.
111. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2017 Jul 1;28:iv1–21.
112. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jul 9;373(2):123–35.
113. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017 Jan 21;389(10066):255–65.
114. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan 1;45(2):228–47.
115. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun 24;12(6).
116. Rohde JK, Fuh MM, Evangelakos I, Pauly MJ, Schaltenberg N, Siracusa F, et al. A Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Method for the Quantification of Short Chain Fatty Acids. *Metabolites* 2022, Vol 12, Page 170. 2022 Feb 11;12(2):170.

117. Langou Fontsa M, Padonou F, Willard-Gallo K. Biomarkers and immunotherapy: where are we? *Curr Opin Oncol*. 2022 Sep 1;34(5):579–86.
118. Shah H, Ng TL. A narrative review from gut to lungs: non-small cell lung cancer and the gastrointestinal microbiome. *Transl Lung Cancer Res*. 2023;12(4):909–26.
119. Duttagupta S, Hakozaki T, Routy B, Messaoudene M. The Gut Microbiome from a Biomarker to a Novel Therapeutic Strategy for Immunotherapy Response in Patients with Lung Cancer. *Curr Oncol*. 2023 Nov 1;30(11):9406–27.
120. Liu B, Chau J, Dai Q, Zhong C, Zhang J. Exploring Gut Microbiome in Predicting the Efficacy of Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 1;14(21).
121. Shoji F, Yamaguchi M, Okamoto M, Takamori S, Yamazaki K, Okamoto T, et al. Gut microbiota diversity and specific composition during immunotherapy in responders with non-small cell lung cancer. *Front Mol Biosci*. 2022 Oct 24;9.
122. Wu Z, Zhang S, Li L, Huang Z, Huang D, Hu Y. The gut microbiota modulates responses to anti-PD-1 and chemotherapy combination therapy and related adverse events in patients with advanced solid tumors. *Front Oncol*. 2022 Oct 25;12.
123. Derosa L, Routy B, Thomas AM, Iebba V, Zalcman G, Friard S, et al. Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2022 Feb 1;28(2):315–24.
124. Haberman Y, Kamer I, Amir A, Goldenberg S, Efroni G, Daniel-Meshulam I, et al. Gut microbial signature in lung cancer patients highlights specific taxa as predictors for durable clinical benefit. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
125. Lee KA, Thomas AM, Bolte LA, Björk JR, de Ruijter LK, Armanini F, et al. Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma. *Nat Med*. 2022 Mar 1;28(3):535–44.
126. Lin Y, Xie M, Lau HCH, Zeng R, Zhang R, Wang L, et al. Effects of gut microbiota on immune checkpoint inhibitors in multi-cancer and as microbial biomarkers for predicting therapeutic response. *Med (N Y)*. 2025;6(3).
127. Mao F, Hu Z, Shi R, Zhang H, Zhang Z, Li Y, et al. Unravelling the prognostic and operative role of intratumoural microbiota in non-small cell lung cancer: Insights from 16S rRNA and RNA sequencing. *Clin Transl Med*. 2025 Jan 3;15(1).
128. Wei Y, Qin L, Wu X, Li D, Qian D, Jiang H, et al. Faecal microbiota transplantation combined with platinum-based doublet chemotherapy and tislelizumab as first-line treatment for driver-gene negative advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): study protocol for a prospective, multicentre, single-arm exploratory trial. *BMJ Open*. 2025 Mar 4;15(3):e094366.
129. Zhang Y, Chen X, Wang Y, Li L, Ju Q, Zhang Y, et al. Alterations of lower respiratory tract microbiome and short-chain fatty acids in different segments in lung cancer: a multiomics analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13.
130. Chen HH, Wu QJ, Zhang TN, Zhao YH. Gut microbiome and serum short-chain fatty acids are associated with responses to chemo- or targeted therapies in Chinese patients with lung cancer. *Front Microbiol*. 2023;14.

131. Shen H, Lu Z, Xu Z, Chen Z, Shen Z. Associations among dietary non-fiber carbohydrate, ruminal microbiota and epithelium G-protein-coupled receptor, and histone deacetylase regulations in goats. *Microbiome*. 2017 Sep 19;5(1):123.
132. Ramesh V, Gollavilli PN, Pinna L, Siddiqui MA, Turtos AM, Napoli F, et al. Propionate reinforces epithelial identity and reduces aggressiveness of lung carcinoma. *EMBO Mol Med*. 2023 Dec 7;15(12).
133. Tamburini S, Clemente JC. Gut microbiota: Neonatal gut microbiota induces lung immunity against pneumonia. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 May 1;14(5):263–4.
134. Inamoto T, Furuta K, Han C, Uneme M, Kano T, Ishikawa K, et al. Short-chain fatty acids stimulate dendrite elongation in dendritic cells by inhibiting histone deacetylase. *FEBS J*. 2023 Dec 1;290(24):5794–810.
135. Kolypetri P, Weiner HL. Monocyte regulation by gut microbial signals. *Trends Microbiol*. 2023 Oct 1;31(10):1044–57.
136. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem*. 2011 Sep;22(9):849–55.
137. Chang P V., Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 11;111(6):2247–52.
138. Pérez M, Buey B, Corral P, Giraldo D, Latorre E. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Boost Antitumoral Natural Killer Cell Activity. *J Clin Med*. 2024 Jul 1;13(13).
139. Zhang D, Jian YP, Zhang YN, Li Y, Gu LT, Sun HH, et al. Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Commun Signal*. 2023 Dec 1;21(1).
140. Luan Y, Liang C, Han Q, Zhou X, Yang N, Zhao L. The systematic analysis of genes related to butyrate metabolism suggests that CDKN3 could serve as a promising therapeutic target for lung adenocarcinoma treatment. *BMC Cancer*. 2025 Dec 1;25(1):69.
141. Mountzios G, Remon J, Hendriks LEL, García-Campelo R, Rolfo C, Van Schil P, et al. Immune-checkpoint inhibition for resectable non-small-cell lung cancer - opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023 Oct 1;20(10):664–77.
142. Tostes K, Siqueira AP, Reis RM, Leal LF, Arantes LMRB. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor Response in NSCLC: Current Developments and Applicability. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 1;24(15).

10. Certificado CEICA

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 27/02/2019, Acta Nº 04/2019 ha evaluado la documentación referida a la solicitud de **evaluación de proyecto** y **cesión de muestras** biológicas del **Biobanco del Sistema de Salud de Aragón** para el proyecto:

Título: Análisis Multiparamétrico de Factores que afectan a la Sensibilidad de los Inhibidores de los Controles Inmunes en Cáncer de Pulmón: Microbioma, Subconjuntos de Linfocitos T y Carga Mutacional Tumoral.

**Investigadores Principales: Dolores Isla Casado y Julián Pardo Jimeno.
Versión proyecto: Versión 1.0 de fecha 01/12/2018**

Colección: Colección de tumores del HCU Lozano Blesa

1º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Tanto la donación como la cesión de muestras se realiza conforme al RD1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica.

2º. Por lo que este CEIC, actuando como Comité de Ética Externo del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón, emite un **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto y a la cesión de las muestras.**

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ
HINJOS MARIA
DNI 03857456B

Firmado digitalmente
por GONZALEZ HINJOS
MARIA - DNI 03857456B
Fecha: 2019.03.01
14:16:16 +01'00'

Dña. María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)